

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 47/48 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680040491.6

[43] 公开日 2008 年 11 月 5 日

[11] 公开号 CN 101300031A

[22] 申请日 2006.10.30

[21] 申请号 200680040491.6

[30] 优先权

[32] 2005.10.31 [33] EP [31] 05110206.9

[32] 2005.11.7 [33] US [31] 60/734,142

[86] 国际申请 PCT/EP2006/067949 2006.10.30

[87] 国际公布 WO2007/051785 英 2007.5.10

[85] 进入国家阶段日期 2008.4.29

[71] 申请人 雪兰诺实验室有限公司

地址 瑞士科因辛斯

[72] 发明人 U·博谢特 A·普罗德富特

L·卡迪 P·A·怀特

J·武伊齐克

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 陈文青

权利要求书 3 页 说明书 60 页 序列表 8 页
附图 14 页

[54] 发明名称

用 SDF-1 治疗和/或预防神经疾病

[57] 摘要

本发明涉及将 SDF-1 或 SDF-1 活性激动剂用于治疗和/或预防神经疾病的应用。

1. SDF-1 或 SDF-1 活性激动剂在生产治疗和/或预防神经疾病的药物中的应用。

2. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, SDF-1 是 SDF-1 α 。

3. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, SDF-1 是 SDF-1 α 变体。

4. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, 所述神经疾病与炎症有关。

5. 如权利要求 4 所述的应用, 其特征在于, 所述炎症是神经炎。

6. 如前述任一项权利要求所述的应用, 其特征在于, 所述神经疾病选自损伤性神经损伤、中风、CNS 或 PNS 的脱髓鞘病、神经疾病。

7. 如前述任一项权利要求所述的应用, 其特征在于, 所述神经疾病是外周神经疾病。

8. 如权利要求 7 所述的应用, 其特征在于, 所述外周神经疾病是糖尿病性神经疾病或神经性疼痛。

9. 如权利要求 6 所述的应用, 其特征在于, 所述外伤性神经损伤包括外周神经的外伤。

10. 如权利要求 6 所述的应用, 其特征在于, 所述外伤性神经损伤包括脊髓外伤。

11. 如权利要求 6 所述的应用, 其特征在于, 所述脱髓鞘病是多发性硬化(MS)。

12. 如权利要求 11 所述的应用, 其特征在于, 所述脱髓鞘病是原发进行性多发性硬化(MS)或继发进行性多发性硬化(MS)。

13. 如权利要求 6 所述的应用, 其特征在于, 所述脱髓鞘病选自慢性炎性多发性硬化、脱髓鞘性多神经疾病(CIDP)和吉兰-巴雷综合征(GBS)。

14. 如前述任一项权利要求所述的应用, 其特征在于, SDF-1 选自:

(a) 含有 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸的多肽

(b) 含有 SEQ ID NO: 4 所示氨基酸的多肽

(c) 含有 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸的多肽

(d) (a)-(c)的一种多肽, 它还包含信号序列, 所述信号序列优选为 SEQ ID

NO: 5 所示的氨基酸

(e) (a)-(d)中任一项的突变蛋白,其氨基酸序列与(a)-(c)中至少一种序列的相同性为至少 40%或 50%或 60%或 70%或 80%或 90%;

(f) (a)-(d)中任一项的突变蛋白,其编码 DNA 序列在高度严谨条件下能与编码(a)-(c)中任一项的天然 DNA 序列的互补物杂交;

(g) (a)-(d)中任一项的突变蛋白,其中氨基酸序列的任何改变是对(a)-(c)中氨基酸序列进行保守性氨基酸取代;

(h) (a)-(d)中任一项的盐或同工型、融合蛋白、功能衍生物或活性部分。

15. 如前述任一项权利要求所述的应用,其特征在于,SDF-1 融合于能促进跨越血脑屏障的载体分子、肽或蛋白质。

16. 如前述任一项权利要求所述的应用,其特征在于,SDF-1 被 PEG 化。

17. 如权利要求 15 所述的应用,其特征在于,所述融合蛋白包含免疫球蛋白(Ig)融合物。

18. 如前述任一项权利要求所述的应用,其特征在于,所述药物还包含同时、依次或分开使用的干扰素和/或骨桥蛋白和/或丛生蛋白。

19. 如权利要求 18 所述的应用,其特征在于,所述干扰素是干扰素- β 。

20. 如前述任一项权利要求所述的应用,其特征在于,所述 SDF-1 的用量约为 0.001-1 mg/kg 体重,或者约 0.01-10 mg/kg 体重,或者约 9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 mg/kg 体重,或者约 0.1-1 mg/kg 体重。

21. 核酸分子在生产治疗和/或预防神经疾病的药物中的应用,其中该核酸分子包含核酸序列 SEQ ID NO: 6 或编码含有选自下组的氨基酸序列的多肽的核酸序列:

(a)含有 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸的多肽

(b)含有 SEQ ID NO: 4 所示氨基酸的多肽

(c)含有 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸的多肽

(d) (a)-(c)的多肽,它还包含信号序列,所述信号序列优选为 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸

(e) (a)-(d)中任一项的突变蛋白,其氨基酸序列与(a)-(c)中至少一种序列的相同性为至少 40%或 50%或 60%或 70%或 80%或 90%;

(f) (a)-(d)中任一项的突变蛋白，其编码 DNA 序列在高度严谨条件下能与编码(a)-(c)中任一项的天然 DNA 序列的互补物杂交；

(g) (a)-(d)中任一项的突变蛋白，其中氨基酸序列的任何改变是对氨基酸序列(a)-(c)进行保守性氨基酸取代；

(h) (a)-(d)中任一项的盐或同工型、融合蛋白、功能衍生物或活性组分。

22. 如权利要求 21 所述的应用，其特征在于，所述核酸分子还包含表达载体序列。

23. 诱导和/或提高细胞中 SDF-1 或 SDF-1 活性激动剂的内源性产生的载体在制备治疗和/或预防神经疾病的药物中的应用。

24. 如权利要求 21-23 中任一项所述，用于基因治疗的应用。

25. 经遗传修饰能产生 SDF-1 或 SDF-1 活性激动剂的细胞在制备治疗和/或预防神经疾病的药物中的应用。

26. 一种用于治疗 and/或预防神经疾病的药物组合物，其含有 SDF-1 或 SDF-1 活性激动剂和干扰素，任选还含有一种或多种药学上可接受的赋形剂。

27. 一种用于治疗 and/或预防神经疾病外周神经疾病的药物组合物，其含有 SDF-1 或 SDF-1 活性激动剂和骨桥蛋白，任选还含有一种或多种药学上可接受的赋形剂。

28. 一种用于治疗 and/或预防神经疾病外周神经疾病的药物组合物，其含有 SDF-1 或 SDF-1 活性激动剂和丛生蛋白，任选还含有一种或多种药学上可接受的赋形剂。

用 SDF-1 治疗和/或预防神经疾病

发明领域

本发明总的属于与神经炎症相关的神经疾病领域。更具体说，本发明涉及 SDF-1 小制备治疗和/或预防神经疾病的药物中的应用。

发明背景

与神经炎症相关的神经疾病。

神经炎症是大多数神经疾病的共有特征。许多种刺激都能触发神经炎症，其或是由神经元或少突胶质细胞损伤所引起，或是外伤、中枢或外周神经损伤或病毒或细菌感染的结果。神经炎症的主要后果是(i)星形胶质细胞、小胶质细胞分泌各种炎性趋化因子；和(ii)补充额外白细胞，其进一步刺激星形胶质细胞或小胶质细胞。在慢性神经变性疾病如多发性硬化(MS)、阿尔茨海默病(AD)或肌萎缩侧索硬化(ALS)中，持续稳定地存在神经炎症会使疾病更加恶化。与神经炎症相关的神经疾病也可称作神经炎性疾病。

慢性神经变性疾病

慢性神经变性疾病的病理学与炎性反应有关。近年来有证据表明全身炎症可影响患病脑部的局部炎症以致脑中炎性细胞因子和其它介质的合成增加，进而影响行为(Perry, 2004)。慢性神经变性疾病包括多发性硬化(MS)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)、亨廷顿病(HD)、肌萎缩侧索硬化(ALS)、多系统萎缩症(multiple system atrophy, MSA)、朊病毒病和唐氏综合征等。

阿尔茨海默病(AD)是一种涉及由脑组织改变而导致精神功能衰退的疾病。它包括不是由血管病症、原发性退变性痴呆和弥散性脑萎缩引起的脑组织收缩。阿尔茨海默病也称为老年痴呆/阿尔茨海默型(痴呆)(SDAT)。过去 10 年来有相当多的证据支持以下论点：神经炎症与阿尔茨海默病(AD)的病理学相关(Tuppo and Arias, 2005)。

帕金森病(PD)是一种脑病，其特点是震颤和行走、运动和协调困难。该疾病与控制肌肉运动的部分脑的损伤有关。它也称为震颤麻痹(paralysis

agitan)或震颤麻痹(shaking palsy)。人类和动物研究的更多证据表明神经炎症对 PD 中的神经元损失有重要的贡献(Gao et al., 2003)。

亨廷顿病(HD)是一种遗传性常染色体显性神经炎性病。该病通常直到生命的第 50 个年头才会有临床表现,引起精神障碍、不随意运动紊乱和认知衰弱,通常在发病 17 年后不可逆转地走向死亡。

肌萎缩侧索硬化(ALS)是一种由于脑和脊髓中的神经细胞遭破坏而进行性丧失对随意肌的神经控制的疾病。肌萎缩侧索硬化,也称为 Lou Gehrig 病,是一种涉及丧失对肌肉的使用和控制的疾病。控制这些肌肉的神经收缩和消失,以致由于缺乏神经刺激而失去肌肉组织。尽管 ALS 的根本原因仍然未知,但神经炎症可能在 ALS 中起着重要的作用(Consilvio et al., 2004)。

多系统萎缩症(MSA)是一种未知病因的偶发性成年发病的神经变性疾病。该病症是慢性神经变疾病中唯一由处于发病过程中的少突神经胶质细胞所,如果不是主要,明显造成的。数据支持炎症相关基因对 MSA 风险的作用(Infante et al., 2005)。其与帕金森病的主要区别在于 MSA 患者对 L-多巴治疗无反应。

多发性硬化(MS)是中枢神经系统(CNS)的炎性脱髓鞘病,具有复发-缓解或进行性病程。MS 不仅是脱髓鞘病。它在外周神经系统(PNS)中的相应病变是慢性炎性脱髓鞘多神经根神经瘤(CIDP)。此外,还有急性单相疾病,如术语为吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barré syndrome(GBS))的 PNS 中的炎性脱髓鞘多神经根神经瘤和 CNS 中的急性弥散性脑脊髓炎(ADEM)。MS 和 GBS 均为异质性综合征(heterogeneous syndrome)。MS 中,外源性攻击和遗传因素共同造成疾病发展最终满足诊断标准。这两种疾病中,神经轴损伤会加重原发性脱髓鞘损伤,造成永久神经缺陷。MS 是一种免疫系统白细胞会对中枢神经系统(CNS)的白质发起攻击的自身免疫病。灰质也会受到牵连。尽管 MS 的确切病因未知,但作用因素可包括遗传、细菌和病毒感染。它的典型表现(占全部病例的 85%)的特征是交替的复发/缓解期,相当于神经功能障碍持续数周后接着又基本上或完全恢复的情况(Noseworthy, 1999)。随着时间的过去,缓解期变短。然后许多患者会进入最终疾病期,

其特征为逐步丧失神经功能而部分或没有恢复。这被称为继发性进行性 MS。小部分(占全部 MS 患者的~15%)在疾病发作后会经历逐步和不断地神经功能衰退(原发性进行性 MS)。

朊病毒病和唐氏综合征也显示出与神经炎症有关(Eikelenboom et al., 2002; Hunter et al., 2004)。

感染后的神经炎性疾病

有些神经疾病如急性弥漫性脑脊髓炎通常在感染病毒或接种病毒(或非常罕见是接种细菌)后发生,表明这是疾病的免疫学原因。接种病毒后发作的急性炎性外周神经疾病或吉兰-巴雷综合征是具有相同的免疫发病机制的相似的脱髓鞘病,但它们只影响周围组织。

HTLV 相关的脊髓病,一种与被人 T 细胞亲淋巴性病毒感染有关的缓慢进行性脊髓病,其特征是双腿痉挛性无力。

中枢神经系统感染是极其严重的感染;脑膜炎会影响脑和脊髓周围的膜;脑炎或影响脑本身。感染中枢神经系统(脑和脊髓)的病毒包括疱疹病毒、虫媒病毒(arboviruses)、柯萨奇病毒、艾柯病毒和肠道病毒。这些感染中有些主要影响脑膜(覆盖脑的组织),引起脑膜炎;其它主要影响脑和引起脑炎;还有许多同时影响脑膜和脑,引起脑膜脑炎。儿童中脑膜炎远远不及脑炎普遍。病毒以两种方式影响中枢神经系统。急性发病期它们直接感染和破坏细胞。从受感染状态恢复后,身体对感染的免疫应答有时会对神经周围的细胞造成继发性伤害。该继发性伤害(感染后脑脊髓炎)会使儿童从急性发病期恢复后其症状仍然持续数周。

受伤后的神经疾病

由急性损伤包括外伤、缺氧和缺血对 CNS 造成的伤害可以影响到灰质和白质。CNS 损伤包括神经炎症。例如,外伤或炎症后,星形胶质细胞中的 MCP-1 趋化因子的上调能够部分触发白细胞浸润 CNS(Panenka et al., 2001)。

外伤是指神经损伤或损害。它可以是脊髓外伤,即影响损伤水平处或以下控制全部神经功能的脊髓损害,包括肌肉控制和感觉,或脑外伤,如由闭合性头部损伤造成的外伤。

脑缺氧具体是大脑两半球缺氧，更常见用该术语来指代整个脑缺氧。根据缺氧的严重性，其症状可以从意识错乱到不可逆性脑损伤、昏迷和死亡。

中风通常是由脑供血减少(缺血)引起的。它又被称为脑血管病或事故。它是当对脑任何部位的供血被阻断时会发生的涉及脑功能丧失的一类脑病。脑需要约占身体 20% 的血液循环。对脑供血主要是通过颈部的 2 条动脉(颈动脉)，然后它们在脑内分成多条动脉，每条供应脑的特定区域。即使是短暂中断该血流也会造成脑功能衰退(神经缺陷)。症状随受影响的脑区而变化，通常包括以下问题，如视力改变、表达能力改变、运动能力或身体某部分感觉下降、或意识水平改变。如果血流减少时间大于数秒，则该区的脑细胞会遭破坏(梗塞)造成脑部该区永久性损伤或者甚至死亡。

外伤性神经损伤可以涉及 CNS 或 PNS。外伤性脑损伤，也简单称作颅脑损伤或闭合性头部外伤，指由外部击打脑部造成的脑损伤。大都发生在汽车或自行车事故中，但也可能由于濒临溺死、心脏病发作、中风和感染造成。这类外伤性脑损伤通常由氧气或脑供血不足所造成，因而可以称作“缺氧性损伤”。当如在摩托车事故或坠落中击中头部时发生会脑损伤或闭合性头部外伤。外伤后马上会有一段时间不省人事，可能持续数分钟、数周或数月。原发性脑损伤发生在受伤时，主要是在撞击部位，尤其是当出现头骨破碎时。大面积挫伤也可能与脑出血有关，或伴有皮质裂伤。弥散性轴索损伤由头骨内脑旋转移动产生的神经元剪切和拉伸应变活动造成。轴突上会有小的出血性损伤或弥散性损伤，只能通过显微镜检测。继发性脑损伤由造成受伤时刻后发展的并发症所造成。它们包括颅内出血、脑外动脉的外伤性损伤、颅内疝出、缺氧性脑损伤或脑膜炎。

脊髓损伤占入院治疗的下身麻痹和四肢麻痹的大部分。超过 80%是由道路事故造成的。临床上可区分出两大类损伤：开放性损伤和闭合性损伤。开放性损伤会造成脊髓和神经根的直接外伤。穿孔性损伤可造成广泛破裂和出血。闭合性损伤占脊髓损伤的多数，通常与脊柱的骨折/错位有关，常可用放射学进行证明。脊髓损伤根据骨损伤程度，可以分成两个主要时期：原发性损伤，有挫伤、神经纤维横断和出血性坏死和继发性损伤，有硬膜

外血肿、梗塞、感染和水肿。

外伤是单神经局部损伤的最主要原因。剧烈的肌肉活动或关节强有力地伸展过度都会产生局部神经疾病，和重复小外伤(如紧抓小工具、被气击过分振动)。压力或挤压性麻痹(entrappment paralysis)通常会影骨突(如，消瘦或恶病质人的熟睡或麻醉期间，和常常在醉酒时)或窄管(如在腕管综合征中)处的浅表神经(尺骨、桡骨、腓骨)。压力性麻痹也可以由肿瘤、骨质增生、投掷、拄拐杖或长时间姿势僵硬(如进行园艺时)引起。外伤性损伤还可能发生在外科手术过程中。

外周神经疾病

外周神经疾病是一种单独或以任何组合具有感觉缺失、肌无力和萎缩、深部腱反射降低和血管舒缩症状的综合征。外周神经疾病与轴突退化有关，该过程也称为沃勒变性。神经炎症对沃勒变性有影响(Stoll et al., 2002)。

该疾病可同时影响单神经(单发性神经疾病)、不同区域内的两条或更多条神经(多发性单神经疾病)或许多神经(多发性神经疾病)。可首先影响轴突(如在糖尿病、莱姆病、尿毒症或中毒中)或髓鞘或施万细胞(如在急性或慢性炎性多发性神经疾病、脑白质营养不良或吉兰-巴雷综合征中)。损伤无髓鞘和髓鞘神经纤维主要会造成温度和疼痛感丧失；损伤大髓鞘神经纤维会造成运动或本体感受缺失。有些神经疾病(如由于铅中毒、使用氨基苯砒、莱姆病(由蜱螫伤造成)、淋病或吉兰-巴雷综合征)主要影响运动神经纤维；其他疾病(如由于癌症性背根神经节炎、麻风病、AIDS、糖尿病或慢性吡哆醇中毒所致)主要影响背根神经节或感觉神经纤维，产生感官症状。偶尔还会涉及颅神经(如吉兰-巴雷综合征、莱姆病、糖尿病和白喉病中)。鉴别有关形态有助于确定病因。

多发性单神经疾病是胶原血管病(如结节性多动脉炎、SLE、修格兰氏综合征(Sjögren's syndrome)、RA)、结节病、代谢性疾病(如糖尿病、淀粉样变)或传染病(如莱姆病、HIV 感染)的继发病。微生物可通过直接侵入神经而引起多发性单神经疾病(如麻疯病)。

由急性发热病引起的多发性神经疾病可以由毒素(如白喉病)或自身免疫反应(如吉兰-巴雷综合征)所致；有时在免疫接种后发病的多发性神经疾

病可能也是由自身免疫所致。

毒性剂通常会引起多发性神经疾病，但有时也会引起单发性神经疾病。它们包括吐根碱、海索比妥、巴比妥、三氯叔丁醇、磺酰胺、苯妥英、呋喃妥因、长春花属生物碱、重金属、一氧化碳、三磷酸甲酯、邻二硝基酚(ortho- dinitrophenol)、许多溶剂、其他工业毒物和某些 AIDS 药物(如扎西他滨、去羟肌苷)。

化疗诱导神经疾病是多种普遍采用的化疗药物，包括长春花属生物碱(长春碱、长春新碱和长春地辛)、含铂药物(顺铂)和紫杉烷(紫杉醇)的突出和严重的副作用。会诱发外周神经疾病是限制用化疗药物进行治疗的共同原因。

营养缺乏和代谢性疾病会引起多发性神经疾病。维生素 B 缺乏通常是病因(如酒精中毒、脚气、恶性贫血、异烟肼诱导的吡哆醇缺乏、吸收不良综合征和妊娠剧吐)。甲状腺功能减退症、卟啉病、结节病、淀粉样变多发性神经疾病和尿毒症也会引发多发性神经疾病。糖尿病可以造成感觉运动末梢多发性神经疾病(常见)、多发性单神经疾病和局部单发性神经疾病(如眼球运动或外展颅神经疾病)。

由代谢性疾病(如糖尿病)或肾衰竭引发的多发性神经疾病发展缓慢，常要经过数月或数年。它通常由下肢感官异常开始，通常远端比近端更严重。末梢刺痛、麻木、剧烈疼痛或者常常明显地缺乏关节本体感受和振动感觉(vibratory sensation)。疼痛感常常在夜晚更糟，通过触碰受影响区域或通过改变温度能够加剧。严重病例中有感官丧失的客观迹象，典型的还伴有手套和袜子分布(stocking-and-glove distribution)。跟腱反射(Achilles)和其它深部肌腱反射消失或缺失。当感官丧失发展到深处时，会形成手指或足趾或夏柯氏关节处的无痛溃疡。感官或本体感受缺乏可导致步法异常。运动困难会造成手指或足趾的肌无力和萎缩。可以另外或选择性地涉及自主神经系统，造成夜间腹泻、泌尿和排泄不便、阳痿或直立性低血压。血管舒缩症状改变。皮肤比正常时更为苍白和干燥，有时会有暗沉色斑；会大量出汗。严重的长期病例中常见营养性改变(皮肤光滑和有光泽、指甲凹陷或褶皱、骨质疏松)。

营养性多发性神经疾病在酗酒和营养不良者中常见。原发性轴突病可

引起继发性脱髓鞘和破坏最长最大神经的轴突。病因是否是因为缺乏三胺或是另一种维生素(如吡哆醇、泛酸、叶酸)尚不清楚。吡哆醇缺乏引起的神经疾病通常仅在摄入异烟肼治疗结核病的人中发生；缺乏或依赖吡哆醇的婴儿会发生抽搐。末梢肢体消瘦和对称性无力通常隐伏但很快会发展，有时伴有感官丧失、感官异常和疼痛。小腿和脚的疼痛、痉挛、冷感、灼热和麻木在触碰时会更糟。病因不明显时可以给予复合维生素，但它们尚未被证明有效。

遗传性神经疾病被分类为感觉运动神经疾病或感觉神经疾病。腓骨肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth disease)是最常见的遗传性感运动神经疾病。较不常见的感觉运动神经疾病自出生就发作，造成更大的残疾。在罕见的感觉神经疾病中，末梢疼痛和温度感觉丧失比振动和位置感觉丧失更为明显。主要的问题是由经常感染和骨髓炎引发疼痛感迟钝继而造成足残毁。遗传性神经疾病还包括肥大的间质神经病(hypertrophic interstitial neuropathy)和德雅兰-索塔斯病(Dejerine-Sottas disease)。

恶性肿瘤也会经由单克隆丙种球蛋白病(多发性骨髓瘤、淋巴瘤)、淀粉样蛋白的入侵(amyloid invasion)或营养缺陷或作为肿瘤伴随综合征而造成多发性神经疾病。

尽管有多种病因，如感染性病原体或自身免疫攻击，神经炎性病均可造成神经功能丧失，可以导致瘫痪和死亡。尽管针对有些神经炎性病提供了一些能削弱炎性攻击的治疗剂，但仍然需要开发能够恢复神经功能的新型疗法。

SDF-1

趋化因子(趋化细胞因子)构成了一类小(8-10kDa)细胞因子超家族，它们能活化在基部运输(basal trafficking)和炎症反应中主要作为白细胞化学引诱剂和活化剂的7次跨膜G蛋白偶联受体。

基质细胞衍生因子-1 α 、SDF-1 α 和它的2种同工型(β 、 γ)是属于间分泌(intercrine)家族的小趋化细胞因子，其成员能活化白细胞，常可被促炎性反应刺激如脂多糖、TNF或IL-1诱导。间分泌(intercrine)的特征是存在4个保守的半胱氨酸，形成了2个二硫键。可以将它们分成2个亚家族。CC亚家族中包括 β -趋化因子，半胱氨酸残基彼此相邻。CXC亚家族中包括 α -趋化因子，

半胱氨酸残基被插入氨基酸隔开。SDF-1 蛋白质属于后面这类。SDF-1 是 CXCR4(LESTR/融合素)趋化因子受体的天然配体。 α 、 β 和 γ 同工型是单基因任选剪切的结果。 α 形式衍生自外显子 1-3, 而 β 形式包含来自外显子 4 的附加序列。SDF-1 γ 的前三个外显子与 SDF-1 α 和 SDF-1 β 的相同。SDF-1 γ 的第四个外显子位于 SDF-1 基因座上距第三个外显子下游 3200bp 处, 在 SDF-1 β 的第三和第四个外显子之间。

近来描述了 3 种新的 SDF-1 同工型, SDF-1 δ 、SDF-1 ϵ 和 SDF-1 ϕ (Yu 等, 2006)。SDF-1 δ 同工型在 SDF-1 α 开放阅读框的最后一个密码子处发生任选剪切, 获得具有 731 个碱基对的内含子, SDF-1 α 的末端外显子被剪切成两段。SDF-1 ϵ 和 SDF-1 ϕ 的前三个外显子与 SDF-1 β 和 SDF-1 γ 同工型的 100%相同。

SDF-1 基因在除血细胞外的细胞内随处表达, 它在体外作用于淋巴细胞和单核细胞但不作用于嗜中性粒细胞, 在体内是单核细胞的高度有潜能的化学引诱物。体外和体内的 SDF 都是表达 CD34 的人造血祖细胞的化学引诱物。

SDF-1 和它的受体 CXCR4 在造血系统和神经系统中具有重要作用, 因为一旦缺失配体或受体都会导致因 CNS 发育异常而造成胚胎致死(Ma et al., 1998; Zou et al., 1998)。

在人 hNT 神经元细胞系中, SDF-1 α 通过与其受体相互作用可以通过细胞凋亡而直接诱导细胞死亡, 这与不成熟的有丝分裂后胆碱能神经元类似, 具有许多神经元特点(Hesselgesser et al., 1998)。

Lazarini 等回顾了 SDF-1 在正在发育的和成熟的中枢神经系统中的作用(Lazarini et al., 2003)。

趋化因子当然与 CNS 中的神经炎症有关, 但它们的活性还包括它们作为生物学上重要的肽直接作用于神经上皮细胞(包括神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞)。具体说, 以 GRO- α / CXCL1 为例, 趋化因子影响少突胶质细胞前体(OLP)的增殖(Robinson et al., 1998), 以 SDF-1 α 为例, 会影响小脑神经胶质细胞的组构(Zhu et al., 2002)和以 fractalkine/ CX3CL1 为例, 会影响小胶质细胞的活化态(Zujovic et al., 2000)等。因此, 在免疫系统和神经系统例中, 趋化因子能表现出大量相似活性, 包括调控增殖、迁移、活化和分化。

许多趋化因子和趋化因子受体在 CNS 中构成性或由炎性介质诱导地表

达。它们包括许多神经病理学过程, 包括多发性硬化(MS)(Bajetto et al., 2001; Sorensen et al., 2002; Zujovic et al., 2000)。

据显示, SDF-1 在脑内皮细胞中的表达有助于为缺血性 CNS 补充免疫细胞(Sorensen et al., 2002; Stumm et al., 2002), 这表明 SDF-1 对神经炎症起着有害作用。就帮助痴呆而言, 据说 SDF-1 能够通过刺激体外神经炎症模型诱导的 gp120 中的活化小胶质细胞产生的 $\text{TNF}\alpha$ 和星形胶质细胞释放谷氨酸盐来诱导神经毒素(Bezzi et al., 2001; Sorensen et al., 2002)。近期有出版物描述了 MS 损伤的星形胶质细胞的 SDF-1 α 表达(Ambrosini et al., 2005)。

在大鼠中诱导实验性变应性脑脊髓炎(EAE)会伴有各种趋化因子受体包括 CXCR4 水平升高(Bezzi et al., 2001; Jiang et al., 1998){Sorensen, Trebst, et al. 2002 154 /id}。

WO00/09152 中提到 CXCR4 拮抗剂可用于治疗自身免疫病、治疗多发性硬化、治疗癌症和抑制血管新生。

WO99/50461 公开了通过给予能促进或抑制 CXCR4 活性的化合物来治疗疾病, 包括细胞增殖异常或细胞增殖不足的方法。CXCR4 功能的抑制剂据称能治疗癌症, 用受体激动剂据称能治疗细胞增殖不足或需要细胞增殖的疾病。细胞增殖不足的疾病包括神经系统脱髓鞘损伤, 其中部分神经系统遭脱髓鞘病包括如多发性硬化和外周神经系统损伤的破坏或伤害。

还提到了 CXCR4/SDF-1 拮抗剂对神经疾病的治疗用途。EP657468B1 中, 提到利用 SDF-1 来治疗造血细胞发育不全或异常增殖、神经元增强或降低、预防或治疗神经元损伤有关的疾病。

WO03/062273 中描述了用 SDF-1 信号通路抑制剂治疗炎症。公开的治疗用途包括 CNS 或任何其它器官中进行免疫和/或炎症抑制会有帮助的自身免疫病或病症或疾病相关的炎症、慢性神经疾病或吉兰-巴雷综合征(Guillain Barre syndrome)。

Gleichmann 等报道了在外周神经受损后, SDF-1- β 的 mRNA 表达会有短暂的略微增加。他们总结到他们的发现首次证明了 SDF-1 同工型在不同的生理条件例如神经系统发育和损伤下会有不同的表达模式(Gleichmann et al., 2000)。

SDF-1 能与翻译后加入多种蛋白质中的高变分支糖类, 通常称为蛋白聚糖

(PG)的糖胺聚糖(GAG)相互作用。这类蛋白质位于细胞膜上、胞外基质中和血流中,在那里还会存在分离的 GAG。PG 或分离的 GAG,可以与可溶性分子形成复合物,能够保护该分子在胞外环境中不被蛋白水解。还提到 GAG 可以帮助将细胞信号分子正确显示给它们的特异性受体,最终还调节靶细胞活性。

就趋化因子而言,看来不同形式的 GAG 能调节炎症部位固定梯度的浓度,接着调节与细胞受体的相互作用,和它们的活化状态(Hoogewerf et al., 1997)。因此,据称对这类相互作用的调节代表着对炎症疾病的治疗方法(Schwarz and Wells, 1999)。

通过用 Ser 组合取代 Lys24、His25 和 Lys27 残基的碱性簇来生成修饰的 SDF-1 α 、SDF-1 3/6(Amara et al., 1999)。该突变体不能结合硫酸乙酰肝素但保有结合和活化 CXCR4 的能力。另一项研究调查了单突变体在相同功能域中的影响,和确定了 SDF-1 α 肝素复合物的特征(Sadir et al., 2001)。Sadir 等还提出葡胺聚糖结合中需要 Arg41 和 Lys43 残基。

发明概述

本发明的目的是提供治疗和/或预防神经疾病的新型手段。

本发明中发现对患有外周神经疾病的体内动物模型给予 SDF-1 α 、Met-SDF-1 α 或 SDF-1 α 变体具有有益影响。还显示, SDF-1 α 及其变体在 LPS 诱导的 TNF- α 释放动物模型,即炎症模型中能够抑制 TNF- α 和 IL-6。

因此,本文的实验证据为治疗神经疾病,具体是那些与神经元和神经胶质细胞功能和神经炎症有关的疾病提供了新的可能性。

因此,本发明涉及 SDF-1 或 SDF-1 活性激动剂在制备治疗和/或预防神经疾病的药物中的应用。

根据本发明, SDF-1 还可与干扰素或骨桥蛋白或丛生蛋白(clusterin)联用来治疗和/或预防神经疾病。本发明还包括用核酸分子、包含 SDF-1 的表达载体和表达 SDF-1 的细胞来治疗和/或预防神经疾病。

本发明还提供了包含 SDF-1 和干扰素或骨桥蛋白或丛生蛋白(clusterin),任选还包含一种或多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

附图简要说明

图 1显示了混合的皮质培养物中以 pg/ml 计算的 TNF- α 和 IL-6 含量，其中在第 14 天，将细胞培养物与 0.001、0.1 和 10 ng/ml SDF-1 α (1.A)或 SDF-1 α 变体(1.B) 37°C 预培育 3 小时，然后补充 5 ng/ml LPS 培育 48 小时。在第 16 天收集上清液，通过特异性 ELISA 测定 TNF- α 和 IL-6 的水平。作为阳性对照，用 25 pM 地塞米松(Dexa)、10 ng/ml IL-10 处理培养物或不处理。作为阴性对照，只用 LPS 处理培养物。

图 2显示了腹膜内注射 200 μ l NaCl (0.9%，无 LPS；基线)或者以 200 μ l NaCl (0.9%，无 LPS)稀释的 4 μ g SDF-1 α 或 SDF-1 α 变体 4 小时后，腹腔内征集平均细胞总数 $\times 10^6 \pm s.e.$ 。

图 3显示了与未治疗小鼠(对照)相比，以皮克每微克总蛋白(pg/mg)计算，由慢性阶段患 EAE 小鼠切下的脊髓提取物中 SDF-1 α 的含量。

图 4显示了坐骨神经粉碎后，用载体(盐水/0.02%BSA)，3、10、30 或 100 μ g/kg 皮下注射 (s.c.) SDF-1 α 和 30 μ g/kg 参比(阳性)对照化合物(IL-6)治疗的小鼠的电生理记录。基线：在载体治疗动物的对侧上获得的值。在损伤后(dpl)第 7、15 和 22 天进行记录。

4.A 代表化合物肌肉动作电位的毫伏(mV)数。

4.B 显示以毫秒(ms)计的化合物肌肉动作电位的潜伏期。

图 5显示了坐骨神经粉碎后，用载体(盐水/0.02% BSA)或 30 μ g/kg s.c. SDF-1 α 变体治疗小鼠的电生理记录。基线：在载体治疗动物的对侧上获得的值。在损伤后(dpl)第 7 和 22 天进行记录。

5.A 代表化合物肌肉动作电位的毫伏(mV)数。

5.B 显示以毫秒(ms)计的化合物肌肉动作电位的潜伏期。

5.C 显示以毫秒(ms)计的化合物肌肉动作电位的持续时间。

图 6显示了坐骨神经粉碎后，用载体(盐水/0.02% BSA)或 100、30、10 μ g/kg s.c. Met-SDF-1 α 治疗小鼠的电生理记录。基线：在载体治疗动物的对侧上获得的值。在损伤后(dpl)第 7 和 14 天进行记录。

6.A 显示以毫秒(ms)计化合物肌肉动作电位的潜伏期。

图 7显示了糖尿病性神经病的链脲霉素 (STZ) 模型中 100, 30, 10 μ g/kg s.c. SDF-1 α 治疗的结果。阳性对照分子是 10 μ g/kg s.c. IL-6。

7.A 代表从第 11 天至第 40 天的体重测定结果

7.B 代表给予链脲霉素后第 7 天的高血糖水平

7.C 显示在给予链脲霉素后第 24 和 40 天测定的化合物肌肉动作电位的潜伏期

7.D 显示 SDF-1 α 对感觉神经传导速度的影响

7.E 代表经过和未经 SDF-1 α 治疗时, 给予链脲霉素后第 40 天的相对髓鞘厚度, 表示为 g-比例

7.F 显示给予链脲霉素后第 40 天坐骨神经中的变性纤维数量

7.G 代表给予链脲霉素 (STZ) 后第 40 天表皮内神经纤维的密度

图 8 显示了在糖尿病性神经病的链脲霉素(STZ)模型中 100、30、10 $\mu\text{g/kg}$ s.c. SDF-1 α 治疗对机械和热异常性疼痛读出值的影响。

8.A 代表给予链脲霉素后第 20 天凡-夫雷丝线检测中测定的阈值压力

8.B 代表给予链脲霉素后第 40 天 52 $^{\circ}\text{C}$ 热板试验中测定的潜伏期

图 9 显示了意大利原发进行性 MS 集合的估算假发现率对阳性标记 R 的数量($R < 100$)作图。

图 10 显示了 SDF-1 基因中的 SNP_A-2185631。

图 11 显示了人 SDF-1 剪接变体的预测氨基酸序列。

图 12 显示, SNP_A-2185631 在 SDF-1 基因中, 位于 SDF-1 ϵ 和 SDF-1 ϕ 的最后一个内含子中。

发明详述

本发明中发现给予 SDF-1 对外周神经疾病的体内动物模型具有有益影响。在坐骨神经压伤所致的神经疾病的鼠科动物模型中, 与神经再生、完整性和活力有关的所有生理学参数均由给予 SDF-1 α 、Met-SDF-1 α 或 SDF-1 α 变体而受到积极影响。

据示, 在 LPS 诱导的 TNF- α 释放动物模型, 即神经-炎症的一般模型中, SDF-1 α 和 SDF-1 α 变体能抑制 TNF- α 和 IL-6。

SDF-1 α 对糖尿病性神经疾病和神经性疼痛的保护性作用如本发明所示。

此外, 还发现了 SDF-1 基因和原发性进行性 MS 间的遗传相关性。

因此,本文提出的实验证据为治疗神经疾病,具体是与神经元和神经胶质细胞功能和神经炎症有关的神经疾病提供了一种新的可能性。

因此,本发明涉及 SDF-1 或 SDF-1 活性的激动剂在制备治疗和/或预防神经疾病的药物中的应用。

本文采用的术语“SDF-1”涉及全长成熟人 SDF-1 α 或其具有 SDF-1 活性的片段,如它与 CXCR4 受体的结合区。本文报道了人 SDF-1 α 的氨基酸序列为附属序列列表中的 SEQ ID NO: 1。本文采用的术语“SDF-1”还涉及衍生自动物如鼠科动物、牛或大鼠的任何 SDF-1,只要其具有足以维持 SDF-1 活性的同一性。

本文采用的术语“SDF-1”还涉及生物活性突变型蛋白和片段,如天然产生的 SDF-1 同工型。已报道了编码不同 SDF-1 同工型的 6 种任选剪切转录变体(SDF-1 同工型 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 ϕ)。本文中报道的人 SDF-1 α 、SDF-1 β 、SDF-1 γ 、SDF-1 δ 、SDF-1 ϵ 和 SDF-1 ϕ 的序列分别为附属序列列表中的 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:16。

本文采用的术语“SDF-1”还包含同工型、突变性蛋白、融合蛋白、功能性衍生物、活性部分、片段或其盐。这些同工型、突变性蛋白、融合蛋白或功能性衍生物、活性部分或片段仍保留了 SDF-1 的生物学活性。优选与野生型 SDF-1 相比,它们具有改进的生物学活性。

术语“SDF-1”具体包括由 SEQ ID NO:1 所确定的人成熟同工型 SDF-1 α 、SEQ ID NO:2 所确定的人成熟 SDF-1 β 、SEQ ID NO:3 所确定的人成熟 SDF-1 γ 、SEQ ID NO:14 所确定的人成熟 SDF-1 δ 、SEQ ID NO:15 所确定的人成熟 SDF-1 ϵ 和 SEQ ID NO:16 所确定的人成熟 SDF-1 ϕ ; SEQ ID NO:7 所确定的具有附加的 N-末端甲硫氨酸的人成熟同工型 SDF-1 α ; SDF-1 α 的截短形式,如 SEQ ID NO:8 所确定的对应于成熟人 SDF-1 α 氨基酸残基 4-68 的形式,SEQ ID NO:9 所确定的对应于成熟人 SDF-1 α 氨基酸残基 3-68 的形式和 SEQ ID NO:10 所确定的对应于具有附加的 N-末端甲硫氨酸的成熟人 SDF-1 α 氨基酸残基 3-68 的形式。术语 SDF-1 还包括包含操作性连接到异源功能域的上述 SDF-1 多肽的融合蛋白,如从以下精选出的一种或多种氨基酸序列:膜结合蛋白的胞外功能域、免疫球蛋白恒定区(Fc 区)、多聚化功能域、输出信号和标签序列(如有助

于亲和纯化的标签序列：HA 标签、组氨酸标签、GST、FLAAG 肽或 MBP。
优选 SEQ ID NO:13 所定义的 SDF-1 α 的 Fc-融合蛋白。

本文采用的术语“SDF-1 α 变体”涉及 GAG 结合活性减弱的 SDF-1 突变体。措辞“GAG 结合活性减弱”或“GAG 结合缺陷”指该 CC-趋化因子突变体结合 GAG 的能力较差，即采用以下所引的公开这类突变体的现有技术中的试验进行检测时，这些突变体中的每种结合 GAG(像硫酸肝素)的比例均比相应的野生型分子低。具体说，这类突变体是在现有技术中已经公开的由 Ser(Amara 等 J Biol Chem. 1999 年 8 月 20 日;274(34):23916-25)或由 Ala 取代 Lys24 His25 和 Lys27 的突变体(SEQ ID NO:4)。可以通过用 Ser 和/或 Ala 组合取代 Lys24、His25 和 Lys27 残基和与葡胺聚糖结合有关的任何其它残基如 Arg41 和 Lys43 的碱性簇来生成其它 GAG 结合缺陷的突变体。可能的组合可以是如 Lys24 Lys27、Lys24 His25、His25 Lys27、Lys24 Arg41、His25 Arg41、Lys27 Arg41、Lys24 Lys43、His25 Lys43、Lys27 Lys43 和 Arg41 Lys43。

术语“SDF-1 α 变体”具体包括具有减弱的 GAG 结合活性和由 SEQ ID NO:4 确定的 SDF-1 α 突变体(具有 Lys24Ala、His25Ala、Lys27Ala 的 SDF-1 α 三元突变体)；具有附加的首位甲硫氨酸残基和三突变 Lys25Ala、His26Ala、Lys28Ala，由 SEQ ID NO:11 所确定的 SDF-1 α 突变体；和 GAG 结合活性减弱的具有单突变 Lys27Cys，由 SEQ ID NO:12 所确定的 SDF-1 α 突变体。本文所定义的 SDF-1 α 变体，具体是由 SEQ ID NO:12 所确定的 SDF-1 α 变体可以用 PEG(聚乙二醇)进行修饰，该方法称为“PEG 化(PEGylation)”。可以采用本领域已知的任何 PEG 化反应来完成 PEG 化(参见例如，EP 0 154 316)。

本发明还包括本文所定义具有 C-末端氨基酸缺失的 SDF-1 和 SDF-1 α 变体。

尤其优选的具有 C-末端氨基酸缺失的 SDF-1 形式是 SDF-1 α 的截短形式，如由 SEQ ID NO:17 所确定的对应于成熟人 SDF-1 α 氨基酸残基 3-67 的形式和 SEQ ID NO:18 所确定的具有附加的 N-末端甲硫氨酸的对应于成熟人 SDF-1 α 氨基酸残基 3-67 的形式。

本文采用的术语“SDF-1 活性激动剂”刺激或模仿 SDF-1 活性的分子，如 SDF-1 受体的竞争性抗体，或通过 SDF-1 受体，如 CXCR4 受体活化信

号通路的小分子量激动剂。

本文采用的术语“SDF-1 活性激动剂”还涉及涉及具有下列作用的试剂：能增强 SDF-1 介导活性，如促进细胞粘附到胞外基质组分、使少突胶质细胞系的细胞形态形成髓鞘生成细胞、促进少突胶质细胞系细胞(如祖或前体细胞)的补充、增殖、分化或成熟或促进保护少突胶质细胞系细胞免遭细胞凋亡和细胞损伤。SDF-1 的类似活性还可用于施旺 (Schwann) 细胞。

本发明优选实施方式中，SDF-1 是 SDF-1 α 。

本发明另一优选实施方式中，SDF-1 是 SDF-1 α 变体。

本文采用的术语“治疗”和“预防”应理解为预防、抑制、缓解、改善或逆转神经疾病的一种或多种症状或病因，以及伴随神经疾病的症状、疾病或并发症。当“治疗”神经疾病时，在发病后给予本发明物质，“预防”指在注意到患者有疾病迹象前给予物质。

本文采用的术语“神经疾病”包括所有已知神经疾病或病症，或 CNS 或 PNS 损伤，包括在“发明背景”中详细描述的那些疾病。

神经疾病包括与 CNS 或 PNS 功能障碍有关的疾病，如与神经传递、头痛、头部外伤、CNS 感染、神经眼科病和颅神经病、运动功能和功能障碍的脑叶疾病、恍惚和昏迷、脱髓鞘病、谵妄和痴呆、颅颈连接异常、癫痫病、脊髓病、睡眠障碍、外周神经系统病、脑血管病或肌肉失常。这些疾病的定义参见例如《诊断和治疗的默克手册(The Merck Manual for Diagnosis and Therapy)》，第 17 版，默克研究实验室(Merck Research Laboratories)出版，1999。

神经炎症在不同的神经疾病中发生。许多刺激能触发神经炎症，它可以经神经元或少突神经胶质损伤诱发，或者由外伤、中枢或外周神经损伤或病毒或细菌感染所致。神经炎症的主要后果是(i)星形胶质细胞、小胶质细胞(microglia)分泌各种炎性趋化因子；和(ii)补充额外的白细胞，其进一步刺激星形胶质细胞或小胶质细胞。慢性神经变性疾病如多发性硬化(MS)、阿尔茨海默病(AD)或肌萎缩侧索硬化(ALS)中，持续存在神经炎症会参与使疾病发展。与神经炎症有关的神经疾病还可以称为神经炎性疾病。

本发明优选实施方式中，神经疾病与炎症，具体是神经炎症相关。

本发明的神经疾病优选选自：外伤性神经损伤、中风、CNS 或 PNS 的脱

髓鞘病、神经疾病和神经变性疾病。

外伤性神经损伤可能关系到 PNS 或 CNS，它可以是脑或脊髓外伤，包括如上“发明背景”中所述的截瘫。

本发明优选实施方式中，外伤性神经损伤包括外周神经外伤或脊髓外伤。

中风可以是脑缺氧或缺血所致。它又称为脑血管病或事故。中风可包括由流到脑部的血液循环不足所造成的脑功能丧失(神经缺乏)。血液循环不足可能由脑中形成血块(血栓)，或动脉粥样硬化斑块碎片或从另一位置运行到脑部的其它物质所致(栓子)。脑内出血(溢血)可能会造成类似中风的症状。中风的最普遍原因是中风继发于动脉粥样硬化(脑血栓形成)，因此本发明还涉及治疗动脉粥样硬化。

外周神经疾病可单独或以任何组合涉及感官丧失综合征、肌无力和萎缩、深部腱反射减少和血管舒缩症状。神经疾病可影响单条神经(单发性神经疾病)、不同区域的两条或多条神经(多发性单神经疾病)或同时影响许多条神经(多神经疾病)。首先会影响轴突(如糖尿病、莱姆病或尿毒症中或遭遇毒性剂时)，或髓鞘或施旺细胞(如急性或慢性炎性多神经疾病、脑白质营养不良或吉兰-巴雷综合征)。可以根据本发明进行治疗的其它神经疾病可以由铅中毒、使用氨基砒、蜂蜇伤、卟啉病或吉兰-巴雷综合征所致，它们可主要影响运动神经纤维。其它，如由癌症性背根神经节炎、麻风病、AIDS、糖尿病或慢性吡哆醇中毒所致的那些疾病，可主要影响背根神经节或感官神经纤维，产生感官症状。如在吉兰-巴雷综合征、莱姆病、糖尿病和白喉中，还可涉及颅神经。

阿尔茨海默病(AD)是一种涉及由脑组织改变而导致精神功能衰退的疾病。它可包括脑组织收缩、原发性退行性痴呆和弥散性脑萎缩。阿尔茨海默病也称为老年痴呆/阿尔茨海默型(痴呆)(SDAT)。

帕金森病(PD)是一种包括震颤和行走、运动和协调困难的脑病。该疾病与控制肌肉运动的部分脑的损伤有关。它也称为震颤麻痹(paralysis agitan)或震颤麻痹(shaking palsy)。

亨廷顿病(HD)是一种遗传性常染色体显性神经疾病。该遗传异常为存在过量串联重复的 CAG 核苷酸序列。具有 CAG 重复的其它疾病包括，例

如脊髓性肌萎缩(SMA), 例如亨汀顿氏病和遗传学命名法中称为脊髓小脑性共济失调(SCA)的多数常染色体显性小脑共济失调(ADCA)病。

肌萎缩侧索硬化, ALS, 是一种会导致进行性丧失对随意肌的神经控制, 包括破坏脑神经细胞和脊髓的疾病。肌萎缩侧索硬化, 也称为 Lou Gehrig 病, 是一种涉及丧失对肌肉的使用和控制的疾病。

多发性硬化(MS)是中枢神经系统(CNS)的炎性脱髓鞘病, 具有复发-缓解或进行性病程。MS 不仅是脱髓鞘病。它在外周神经系统(PNS)中的相应病变是慢性炎性脱髓鞘多神经根神经瘤(CIDP)。此外, 还有急性单相疾病, 如术语为吉兰-巴雷综合征(GBS)的 PNS 中的炎性脱髓鞘多神经根神经瘤和 CNS 中的急性弥散性脑脊髓炎(ADEM)。其它神经疾病包括髓鞘形成异常的神经病变, 例如上述“发明背景”中所列出的那些, 以及腕管综合征。外伤性神经损伤可伴发脊柱畸形并发症, 那些也属于本发明的疾病中。

不太熟知的神经疾病也属于本发明范围内, 如神经纤维瘤病或多系统萎缩症(MSA)。可以根据本发明进行治疗的其它疾病详细描述于上述“发明背景”中。

在进一步优选的实施方式中, 神经疾病是外周神经疾病, 最优选是糖尿病性神经疾病。根据本发明还优选化疗相关/诱导的神经疾病。

术语“糖尿病性神经疾病”指任何形式的糖尿病性神经疾病, 或者与糖尿病性神经疾病伴发或由其引起的一种或多种症状或疾病, 或者在上述“发明背景”中详细描述的影响神经的糖尿病并发症。糖尿病性神经疾病可以是多发性神经疾病。糖尿病性多发性神经疾病会同时影响许多神经。糖尿病性神经疾病还可以是单发性神经疾病。例如, 在局部单一神经疾病中, 疾病会影响单条神经, 如动眼或外展脑神经。它还可以是影响不同区域的两条或多条神经的多发性单神经疾病。

在一进一步优选的实施方式中, 该神经疾病是脱髓鞘病。脱髓鞘病优选包括 CNS 的脱髓鞘病, 像急性弥散性脑脊髓炎(ADEM)和多发性硬化(MS), 以及外周神经系统(PNS)的脱髓鞘病。后者包括疾病如慢性炎性脱髓鞘多发性神经疾病(CIDP)和急性单相病, 如称为吉兰-巴雷综合征(GBS)的炎性脱髓鞘多发性神经疾病。

在进一步优选的实施方式中，该脱髓鞘病是多发性硬化病。

在本发明尤其优选的实施方式中，该脱髓鞘病是原发性进行性多发性硬化病。

在本发明另一尤其优选的实施方式中，该脱髓鞘病是继发性进行性多发性硬化。在还进一步优选的实施方式中，该脱髓鞘病选自慢性炎性多发性硬化、脱髓鞘多发性神经疾病(CIDP)和吉兰-巴雷综合征(GBS)，

本发明进一步优选的实施方式涉及治疗和/或预防神经变性疾病。该神经变性疾病选自阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病和 ALS。

优选的 SDF-1 是选自以下组的肽、多肽或蛋白质：

(a)包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸的多肽

(b)包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸的多肽

(c)包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸的多肽

(d)(a)-(c)的多肽，它还包含信号序列，所述信号序列优选为 SEQ ID NO:5 的氨基酸

(e)(a)-(d)中任一种的突变蛋白，其氨基酸序列与(a)-(d)的序列中至少一种有至少 40%或 50%或 60%或 70%或 80%或 90%的同一性；

(f)(a)-(d)中任一种的突变蛋白，由能与编码(a)-(d)中任一种的天然 DNA 序列的补体在高度严格条件下杂交的 DNA 序列所编码；

(g)(a)-(d)中任一种的突变蛋白，其氨基酸序列的任何改变都是针对(a)-(d)中氨基酸序列的保守性氨基酸取代；

(h)(a)-(d)中任一种的盐或同工型、融合蛋白、功能性衍生物或活性部分 (fraction)。

活性部分或片段可以包含任何 SDF-1 同工型的任何部分或功能域，如 C-末端部分的 N-末端部分或任何 SDF-1 同工型。

本领域技术人员知道即使是再小的 SDF-1 部分也可足以发挥它的功能，如包含 SDF-1 功能所需的必要氨基酸残基的活性肽，如它的 CXCR4 受体的结合位点。受体结合位点可以例如通过使固定受体接触其标记配体和未标记检测蛋白来确定，由此，与对照相比标记配体结合率降低则指示检测蛋白中的受体结合活性位点。另一表面等离子共振光谱(Surface

Plasmon Resonance Spectroscopy)试验中, 将待分析受体或蛋白质固定在流动室中的平面传感器船上, 之后使含有预定作用性配体(partner)的溶液以连续流(continuous flow)流经该第一蛋白, 以限定角度对芯片照射光, 测量反射光的共振角; 蛋白质-蛋白质相互作用的建立会使角度发生改变(如 BIACore®, 生物核心国际 AB 公司(Biacore International AB))。Phizicky EM 和 Fields S 还评论了适于分析蛋白质-蛋白质相互作用(如亲和色谱、亲和印迹和免疫共沉淀(coimmunoprecipitation))或评估结合亲和力(如蛋白质亲和色谱、沉降、凝胶过滤、荧光方法、平衡溶液的固相取样和表面等离子共振)的其他技术。(Phizicky and Fields, 1995; Sadir et al., 2001)。

本领域技术人员还应知道 SDF-1 的突变蛋白、盐、同工型、融合蛋白、功能性衍生物或活性部分将保留与 SDF-1 类似甚至更佳生物学活性。SDF-1 和突变蛋白、同工型、融合蛋白或功能性衍生物、活性片段或部分或其盐的生物学活性可以利用细胞系统以生物试验进行检测。

优选的活性部分具有与全长 SDF-1 活性相同或更佳的, 或者更为有益的活性, 如稳定性更佳或毒性或免疫原性更低, 或者它们更易于大量生产, 或者更易于纯化。本领域技术人员应知道可以通过在合适的质粒中克隆出相应的 cDNA 来产生突变蛋白、活性片段和功能性衍生物, 和如上所述在细胞试验中检测它们。

本发明的蛋白质可以是糖基化的或非-糖基化的, 它们可以衍生自天然来源, 如体液, 或者它们可以优选重组产生。可以在原核表达系统如大肠杆菌或真核生物如昆虫细胞和优选在哺乳动物表达系统如 CHO-细胞或 HEK-细胞中进行重组表达。而且, 只要能够保留其神经保护作用, 可以通过在 N-末端除去或加入甲硫氨酸(Met)或氨基氧戊烷(aminooxypentane, AOP)来修饰、延长或缩短本发明的蛋白质。

本文采用的术语“突变蛋白”指 SDF-1 类似物, 其中天然 SDF-1 的一种或多种氨基酸残基被不同的氨基酸残基取代, 或缺失, 或 SDF-1 天然序列中加入了一种或多种氨基酸残基, 但与野生型 SDF-1 相比却未可观地改变结果产物的活。通过合成和/或定位诱变技术, 或因此适用的任何其它已知技术来制备这些突变蛋白。

可用于本发明中的 SDF-1 突变蛋白或其编码核酸，包括本领域普通技术人员基于本文提出的教义和指导无需过分实验即可常规获得的作为取代肽或多核苷酸的基本上对应序列的有限集。

本发明的突变蛋白包括在中度或高度严格条件下，能与编码本发明 SDF-1 的 DNA 或 RNA 杂交的编码 SDF-1 的核酸如 DNA 或 RNA 编码的蛋白质。编码 SDF-1 α 的 cDNA 是 SEQ ID NO:6。术语“严格条件”指本领域普通技术人员常规称为“严格”的杂交和后续洗涤条件。参见 Ausubel 等，《分子生物学实验方法前沿(Current Protocols in Molecular Biology)》，同上，纽约因特科学(Interscience, N.Y.), §§6.3 和 6.4 (1987, 1992)和 Sambrook 等(Sambrook, J.C., Fritsch, E.F.,和 Maniatis, T.(1989) 《分子克隆：实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)》，冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)，纽约冷泉港)。

并非限制性的严格条件的例子包括洗涤条件：在低于研究杂交 T_m 计算值 12-20°C时在如 2 x SSC 和 0.5%SDS 中洗涤 5 分钟，2 x SSC 和 0.1%SDS 中洗涤 15 分钟；在 37°C下在 0.1 x SSC 和 0.5%SDS 中洗涤 30-60 分钟和然后，在 68°C时在 0.1 x SSC 和 0.5%SDS 中洗涤 30-60 分钟。本领域普通技术人员知道严格条件还取决于 DNA 序列的长度、寡核苷酸探针(如 10-40 个碱基)或混合寡核苷酸探针。如果使用混合探针，则优选采用四甲基氯化铵(TMAC)来代替 SSC。参见 Ausubel，同上。

在优选实施方式中，任何这类突变蛋白与附加列表中的 SEQ ID NO:1-4 的序列具有至少 40%同一性或同源性。更优选，它具有至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%或最优选至少 90%的同一性或同源性。

同一性指通过序列比对确定的两种或多种多肽序列或两种或多种多核苷酸序列之间的关系。通常，同一性指两种多核苷酸或两种多肽序列的核苷酸与核苷酸或氨基酸与氨基酸分别在进行比较的序列长度内精确对应。

就未精确对应的序列而言，可以确定其“%同一性”。通常，将待比较的两种序列进行比对给出序列间的最大对应。该方法可以包括在一种或两种序列中插入“间隔”来增强对齐程度。可以在每种比较序列的全长上测定%同一性(因而称为全局比对)，它尤其适合比对长度相同或非常相似的

序列,或者在较短的限定长度(因而称为局部比对)上比对,它更适合长度不相等的序列。

比较两种或多种序列的同一性和同源性的方法为本领域所熟知。因此,例如,威斯康星序列分析包 9.1 版(Devereux et al., 1984)中提供的例如 BESTFIT 和 GAP 程序,可用于测定两种多核苷酸间的%同一性和两种多肽序列间的%同一性和%同源性。BESTFIT 采用 Smith 和 Waterman(Smith and Waterman, 1981)的“局部同源性”算法和可以找到两种序列间的最佳相似性单区。测定两种序列间同一性和/或相似性的其他程序也为本领域所知,例如可以通过 NCBI 主页 www.ncbi.nlm.nih.gov 获得的 BLAST 程序家族(Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997),和 FASTA(Pearson, 1990; Pearson and Lipman, 1988)。

本发明优选的突变蛋白改变是称为“保守”取代的改变。SDF-1 多肽的保守氨基酸取代可以包括一类同义氨基酸,它们具有充分相似的物理化学特性使得该类成员间的取代能保留分子的功能(Grantham, 1974)。很明显还可以对上面所定义的序列进行氨基酸插入和缺失而不会改变它们的功能,尤其如果插入或缺失仅涉及少许氨基酸时,例如在 30 个以下和优选在 10 个以下和不除去或替换对功能性构想重要的氨基酸,例如半胱氨酸残基。由这类缺失和/或插入所产生的蛋白质和突变蛋白属于本发明范围内。

优选的同义氨基酸组如表 I 所述。更优选的同义氨基酸组如表 II 所述;和最优选的同义氨基酸组如表 III 所述。

表 I

优选的同义氨基酸组

<u>氨基酸</u>	<u>同义组</u>
Ser	Ser、Thr、Gly、Asn
Arg	Arg、Gln、Lys、Glu、His
Leu	Ile、Phe、Tyr、Met、Val、Leu
Pro	Gly、Ala、Thr、Pro
Thr	Pro、Ser、Ala、Gly、His、Gln、Thr

Ala	Gly、Thr、Pro、Ala
Val	Met、Tyr、Phe、Ile、Leu、Val
Gly	Ala、Thr、Pro、Ser、Gly
Ile	Met、Tyr、Phe、Val、Leu、Ile
Phe	Trp、Met、Tyr、Ile、Val、Leu、Phe
Tyr	Trp、Met、Phe、Ile、Val、Leu、Tyr
Cys	Ser、Thr、Cys
His	Glu、Lys、Gln、Thr、Arg、His
Gln	Glu、Lys、Asn、His、Thr、Arg、Gln
Asn	Gln、Asp、Ser、Asn
Lys	Glu、Gln、His、Arg、Lys
Asp	Glu、Asn、Asp
Glu	Asp、Lys、Asn、Gln、His、Arg、Glu
Met	Phe、Ile、Val、Leu、Met
Trp	Trp

表 II
更优选的同义氨基酸组

<u>氨基酸</u>	<u>同义组</u>
Ser	Ser
Arg	His、Lys、Arg
Leu	Leu、Ile、Phe、Met
Pro	Ala、Pro
Thr	Thr
Ala	Pro、Ala
Val	Val、Met、Ile
Gly	Gly
Ile	Ile、Met、Phe、Val、Leu
Phe	Met、Tyr、Ile、Leu、Phe

Tyr	Phe、Tyr
Cys	Cys、Ser
His	His、Gln、Arg
Gln	Glu、Gln、His
Asn	Asp、Asn
Lys	Lys、Arg
Asp	Asp、Asn
Glu	Glu、Gln
Met	Met、Phe、Ile、Val、Leu
Trp	Trp

表 III
最优选的同义氨基酸组

<u>氨基酸</u>	<u>同义组</u>
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu、Ile、Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile、Met、Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys、Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn

Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met、Ile、Leu
Trp	Met

产生能用来获得 SDF-1、多肽或蛋白质的突变蛋白用于本发明的蛋白质氨基酸取代的例子包括任何已知的方法步骤，如 Mark 等的美国专利 4,959,314、4,588,585 和 4,737,462；Koths 等的 5,116,943、Namen 等的 4,965,195；Chong 等的 4,879,111 和 Lee 等的 5,017,691 中提到的那些；和美国专利号 4,904,584(Shaw 等)中提到的赖氨酸取代蛋白质。

术语“融合蛋白”指包含 SDF-1 或其突变蛋白或片段，与另一种蛋白质融合的多肽，其例如在体液中有延长的停留时间。因此，SDF-1 可以与另一种蛋白质、多肽等，如免疫球蛋白或其片段融合。

本文采用的“功能性衍生物”涵盖通过本领域已知方法从发生在残基侧链或 N-或 C-末端基团上的功能性基团制备的 SDF-1 和它们的突变蛋白和融合蛋白的衍生物，只要它们保留了药学上可接受性，即，它们不会破坏基本上与 SDF-1 活性相似的蛋白质活性和不会为含有它的组合物带来毒性，则均包含在本发明中。

这些衍生物可以，例如，包括聚乙二醇侧链，其可掩盖抗原位点和延长 SDF-1 在体液中的停留时间。其它衍生物包括羧基的脂族酯、通过与氨或初级或次级胺反应形成的羧基的酰胺、与酰基部分形成的氨基酸残基的无氨基 N-酰基衍生物(如烷酰基或碳环芳酰基)或与酰基部分形成的无羟基 O-酰基衍生物(例如丝氨酰或苏氨酰残基)。

本发明的 SDF-1、突变蛋白和融合蛋白的“活性片段”涵盖单独或与连接其上的相关分子或残基如糖或磷酸盐残基，或蛋白质分子或糖残基的自身聚集体结合的蛋白质分子多肽链的任何片段或前体，其前提是所述片段基本上与 SDF-1 相似。

本文的术语“盐”指 SDF-1 分子或其类似物的氨基的羧基盐和酸加成盐。羧基盐可以由本领域已知方法形成，包括无机盐，例如，钠、钙、铵、

铁或锌盐等和具有如与胺形成的具有有机碱基的盐，如三乙醇胺、精氨酸或赖氨酸、哌啶、普鲁卡因等。酸加成盐包括例如，无机酸例如盐酸或硫酸的盐和有机酸例如乙酸或草酸的盐。当然，任何这类盐必须保留本发明 SDF-1 的生物活性，即，在神经疾病中的神经保护性作用。

本发明一优选实施方式中，SDF-1 与运载体分子、肽或蛋白质融合以促进穿透血脑屏障(“BBB”)。在那些疾病涉及 CNS 的病例中，这有助于将分子适当地靶向到作用位点。透过 BBB 的药物递送形态会由渗透性方法或由采用血管活性物质如缓激肽而生物化学性破坏 BBB。其他穿透 BBB 的措施需要用到内源性运输系统，包括运载体介导的运输体如葡萄糖和氨基酸运载体；受体介导的针对胰岛素或转铁蛋白的转胞吞作用(transcytosis)；和活性外排性运输体(active efflux transporter)如 p-糖蛋白；穿膜肽(Penetratin)，即衍生自触角足同源蛋白(Antennapedia homeoprotein)和它的衍生物的第三螺旋功能域的 16-基体肽(pAntp)。将药物递送到 BBB 后的策略还包括大脑内植入。

SDF-1 的功能性衍生物可以与聚合物偶联以改善蛋白质性质，如稳定性、半衰期、生物利用度、人体耐受度或免疫原性。为了实现该目的，可以使 SDF-1 连接到例如聚乙二醇(Polyethyenglycol, PEG)。PEG 化可以由已知方式实现，如 WO 92/13095 中所述。例如，SDF-1 α 可以在糖胺聚糖结合残基处如 Lys24、His25、Lys27、Arg41 或 Lys43 进行 PEG 化。

因此，在本发明的优选实施方式中，SDF-1 经 PEG 化。

在本发明还要优选的实施方式中，该融合蛋白包括免疫球蛋白(Ig)融合。该融合可以是直接的，或经由长度短至 1-3 个氨基酸残基或更长例如长度为 13 个氨基酸残基的短接头肽链接。所述接头可以例如是具有序列 E-F-M(Glu-Phe-Met)的三肽，或者例如在 SDF-1 序列和免疫球蛋白序列间引入包含 Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met 这 13-氨基酸接头序列。得到的融合蛋白具有改进的特性，如在体液中的停留时间延长(半衰期)，或特异性增强、表达水平提高。该 Ig 融合可以还有助于融合蛋白的纯化。

在还有另一优选实施方式中，SDF-1 与 Ig 分子的恒定区融合。它优选与重链区，例如像人 IgG1 的 CH2 和 CH3 融合。Ig 分子的其它同工型也适

于产生本发明的融合蛋白，如 IgG₂ 或 IgG₄ 同工型，或其它 Ig 类，例如像 IgM。融合蛋白可以是单体或多体、异源或同源多聚体。该融合蛋白的免疫球蛋白部分可以一定方式进行进一步改良以致不会活化补体结合或补体级联反应或与 Fc-受体结合。

此外，SDF-1 的融合蛋白可以通过融合分离自其它允许形成的蛋白质各区或二聚体、三聚体等来制备。能使本发明多肽多聚化的蛋白质序列的例子是分离自蛋白质如 hCG(WO 97/30161)、胶原 X(WO 04/33486)、C4BP(WO 04/20639)、Erb 蛋白(WO 98/02540)或卷曲螺旋肽(WO 01/00814)的各区。

本发明还涉及 SDF-1 和免疫抑制剂的组合在制备同时、相继或分开使用来治疗和/或预防神经疾病的药物中的应用。免疫抑制剂可以是类固醇、甲氨蝶呤、环磷酰胺、抗白细胞抗体(如 CAMPATH-1)等。

本发明还涉及 SDF-1 和干扰素和/或骨桥蛋白和/或丛生蛋白的组合在制备同时、相继或分离使用来治疗和/或预防神经疾病的药物中的应用。

本专利申请中采用的术语“干扰素”旨在包括文献中定义为干扰素的任何分子，包括录入上述“发明背景”中提到的任何类型的 IFN。干扰素优选是人源的，但也可以衍生自其它物种，只要其生物学活性与人干扰素相似和该分子对人无免疫原性即可。

具体说，上述定义中包括任何类型的 IFN- α 、IFN- β 和 IFN- γ 。IFN- β 是本发明优选的 IFN。

本发明采用的术语“干扰素- β (IFN- β)”旨在包括通过从生物液中分离获得或通过 DNA 重组技术从原核或真核宿主细胞获得的人成纤维细胞干扰素以及它的盐、功能性衍生物、变体、类似物和片段。

尤其重要的是衍生化的或与持久络合剂组合的蛋白质。根据本发明，可以采用例如上述 PEG 化的类型，或经基因工程化后在体内呈现持久活性的蛋白质。

术语“衍生物”应该只包括不将一种氨基酸改变为二十种常见天然氨基酸中另一种氨基酸的衍生物。

干扰素还可偶联于聚合物，以提高蛋白质的稳定性。干扰素 β 和多元醇聚乙二醇(PEG)之间的偶联物参见(例如)WO99/55377。

在本发明的另一优选实施方式中，干扰素是干扰素- β (IFN- β)，更优选为 IFN- β 1a。

SDF-1 优选与干扰素同时、依次或分开使用。

在本发明的优选实施方式中，SDF-1 用量约为 0.001-1 mg/kg 体重，或者约 0.01-10 mg/kg 体重，或者约 9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 mg/kg 体重，或者约 0.1-1 mg/kg 体重。

本发明还涉及核酸分子在生产治疗和/或预防神经疾病的药物中应用，其中所述核酸分子包含核酸序列 SEQ ID NO: 6 或编码含有选自下组的氨基酸序列的多肽的核酸序列：

(a)含有氨基酸 SEQ ID NO: 1 的多肽

(b)含有氨基酸 SEQ ID NO: 4 的多肽

(c)含有氨基酸 SEQ ID NO: 7 的多肽

(d)多肽(a)-(c)，它还包含信号序列，所述信号序列优选为 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸

(e) (a)-(d)中任一项的突变蛋白，其氨基酸序列与(a)-(c)中至少一种序列的相同性为至少 40%或 50%或 60%或 70%或 80%或 90%；

(f) (a)-(d)中任一项的突变蛋白，其编码 DNA 序列在高度严谨条件下能与编码(a)-(c)中任一项的天然 DNA 序列的互补物杂交；

(g) (a)-(d)中任一项的突变蛋白，其中氨基酸序列的任何改变是对氨基酸序列(a)-(c)的保守性氨基酸取代；

(h) (a)-(d)中任一项的盐或同工型、融合蛋白、功能衍生物或活性组分。

可通过(例如)肌肉内注射给予裸露核酸分子形式的核酸。

核酸分子还可包含用于在人体内、优选在合适细胞或组织内表达核酸分子编码基因的载体序列，如病毒序列。

因此，在优选实施方式中，核酸分子还包含表达载体序列。本领域熟知表达载体序列，它们还包括用于表达感兴趣基因的元件。它们可包含调控序列，如启动子和增强子序列、选择性标记序列、复制起点等。因此，采用基因治疗方法治疗和/或预防该疾病。有利的是，随后在原位表达 SDF-1。

在优选实施方式中，表达载体是慢病毒衍生载体。慢病毒载体在转移基因方面，特别是在 CNS 中非常有效。其它良好建立的病毒载体，如腺病毒衍生载体，也可用于本发明。

可采用靶向载体来提高 SDF-1 跨越血脑屏障的能力。这类载体可靶向(例如)转铁蛋白受体或其它内皮转运机制。

在本发明的优选实施方式中，可通过肌肉内注射给予表达载体。

本发明还考虑了使用载体诱导和/或提高在通常 SDF-1 表达沉默，或 SDF-1 表达量不足的细胞中 SDF-1 的内源性产量。该载体可包含在需要表达 SDF-1 的细胞中有功能的调控序列。这类调控序列可能是(例如)启动子或增强子。随后可通过同源重组将调控序列引入基因组的合适基因座，从而将调控序列与需要诱导或增强其表达的基因操作性相连。该技术通常称为“内源性基因激活”(EGA)，参见(例如)WO 91/09955。

本发明还涉及经遗传修饰能产生 SDF-1 的细胞在制备治疗和/或预防神经疾病的药物的应用。

本发明还涉及用于生产治疗和/或预防神经疾病的药物的经遗传修饰能产生 SDF-1 的细胞。因此，可采用细胞治疗方法，以便将药物递送至人体的适当部位。

本发明还涉及特别可用于预防和/或治疗神经疾病的药物组合物，其包含治疗有效量的 SDF-1 和治疗有效量的干扰素和/或骨桥蛋白和/或丛生蛋白，任选还包含治疗有效量的免疫抑制剂。

“药学上可接受”的定义包括不干扰活性成分生物学活性的有效性且给予时对宿主无毒、或者可提高其活性的任何载体。例如，就胃肠道外给药而言，可以将活性蛋白配制成单位剂型，以便通过载体如盐水、右旋糖溶液、血清白蛋白和林格氏溶液注射。

可通过各种方式将本发明药物组合物的活性成分给予个体。给药途径包括皮内、透皮(如缓释制剂)、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、口服、硬膜外、局部、鞘内、直肠和鼻内途径。可采用任何其它治疗有效的给药途径，例如通过上皮或内皮组织吸收或通过基因治疗给药，在基因治疗中将编码活性剂的 DNA 分子给予患者(如通过载体)，以使活性物质在体内表达

和分泌。

此外，本发明蛋白质可与生物学活性药物的其它组分一起给药，这些组分包括(例如)药学上可接受的表面活性剂、赋形剂、运载体、稀释剂和载体。

就胃肠道外(如静脉内、皮下、肌肉内)给药而言，可将活性蛋白质与药学上可接受的胃肠道外载体(如水、盐水、右旋糖溶液)和维持等渗性的添加剂(如甘露醇)或维持化学稳定性的添加剂(如防腐剂和缓冲液)一起配制成溶液、悬浮液、乳液或冻干粉末。通过常用技术对该制剂灭菌。

也可通过偶联方法改进本发明活性蛋白质的生物利用度，该方法能提高该分子在人体内的半衰期，该方法(例如)将该分子连接于聚乙二醇(PEG)分子，如 PCT 专利申请 WO 92/13095 所述。

活性蛋白质的治疗有效量与许多变量有关，包括蛋白质类型、蛋白质的亲和力、拮抗剂所具有的残留细胞毒活性、给药途径、患者的临床状况(包括对维持无毒水平的内源性 SDF-1 活性的需求)。

"治疗有效量"是给药时，SDF-1 对神经疾病产生有益效果的用量。作为单剂量或多剂量给予个体的剂量将取决于各种因素，包括 SDF-1 药代动力学特性、给药途径、患者状况和特征(性别、年龄、体重、健康状况、身高)、症状程度、并行治疗、治疗频率和所需效果。

如上所述，SDF-1 的优选用量为约 0.001-1 mg/kg 体重，或者约 0.01-10 mg/kg 体重，或者约 9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 mg/kg 体重，或者约 0.1-1 mg/kg 体重。

本发明优选的给药途径是皮下给药途径。本发明还优选肌肉内给药。

在进一步优选的实施方式中，每天或每隔一天给予 SDF-1。

通常以分份剂量或缓释形式给予每日剂量，以便有效获得所需结果。可以等于、小于或大于初始给药剂量或前次给药剂量的剂量对个体进行第二次或后续给药。

根据本发明，可以在给予另一种治疗方案或药物(如多药物方案)之前、同时或之后将给予治疗有效量的 SDF-1 预防性或治疗性给予个体，特别是与干扰素一起给药。与其它治疗剂同时给药的活性物质可以在相同或不同

的组合物中给药。

本发明还涉及一种治疗神经疾病的方法，所述方法包括给予需要治疗的患者有效量的 SDF-1 或 SDF-1 活性激动剂，任选与药学上可接受的运载体一起给药。

本发明也包括一种治疗神经疾病的方法，所述方法包括给予需要治疗的患者有效量的 SDF-1 或 SDF-1 活性激动剂和干扰素，任选与药学上可接受的运载体一起给药。

本发明也包括一种治疗神经疾病的方法，所述方法包括给予需要治疗的患者有效量的 SDF-1 或 SDF-1 活性激动剂和骨桥蛋白，任选与药学上可接受的运载体一起给药。

本发明也包括一种治疗神经疾病的方法，所述方法包括给予需要治疗的患者有效量的 SDF-1 或 SDF-1 活性激动剂和丛生蛋白，任选与药学上可接受的运载体一起给药。

本文引用的所有参考文献，包括期刊文章或摘要、公开或未公开的美国或外国专利申请，批准的美国或外国专利或任何其它参考文献均以全文纳入本文作参考，包括引用参考文献中出现的所有数据、表格、图片和文本。此外，也将本文引用的参考文献中引用的参考文献的所有内容纳入本文作参考。

提到已知的方法步骤、常规方法步骤、已知方法或常规方法并不以任何方式承认相关领域已经公开、出现或提示过本发明的任何方面、说明或实施方式。

因此，上述具体实施方式的描述完全公开了本发明的总体情况，以致于其他人通过应用本领域技术人员知识(包括本文引用参考文献的内容)，不难根据各种应用修改和/或适应这类实施方式(无需过多实验)，这不会背离本发明的总体构思。因此，根据本文提供的知识和指南，这类适应和修饰应属于所公开实施方式的含义范围内。应理解，本文所用的短语或术语只是为了描述而非限制，因此本说明书的术语或短语应该由本领域技术人员根据本文所述的内容和指南、结合本领域普通技术人员的知识进行解释。

现在已经描述了本发明，参照以下实施方式能更容易得理解本发明，这些实施方式仅仅是为了说明、而不应限制本发明。

实施例

在室内产生人重组趋化因子 SDF-1 α 和 SDF-1 α 变体。将编码序列 (SDF-1 α 的 SEQ ID NO:1 和 SDF-1 α 变体的 SEQ ID NO:4)克隆到 pET20b+ 载体的 NdeI/BamHI 位点中, 在大肠杆菌(*E. Coli*)细胞中表达。

实施例 1: 用 LPS 处理的混合皮质培养物中 SDF-1 和 SDF-1 变体活性介绍

虽然考虑了免疫赦免区, 但 CNS 可显示显著的炎症反应, 这种反应可能在许多神经疾病中起作用。就启动和维持 CNS 炎症而言, 小胶质细胞似乎特别重要。这些细胞以休眠状态存在于正常 CNS 中, 但被感染或 T 细胞刺激后获得了巨噬细胞样特性(包括活性吞噬作用、递呈抗原所需的蛋白上调和产生促炎细胞因子)。

脂多糖(LPS)可以在体外和体内模拟这种炎性环境, 脂多糖是革兰阴性菌的外膜组分。LPS 是鉴定得最充分的先天识别的例子, 它能够通过 Toll 受体 4 使巨噬细胞发生强烈的炎症反应。本领域中广泛使用 LPS 来激活纯培养物、共同培养物或混合培养物中的小胶质细胞。低水平的 LPS 能诱导细胞因子释放, 而不诱导细胞死亡, 较高剂量可诱导少突胶质细胞或神经元在体外(Lehnardt et al., 2002; Sadir et al., 2001)和体内(Lehnardt et al., 2003; Sadir et al., 2001)变性。

材料和方法

原代混合皮质培养物的制备

如(Lubetzki 等, 1993)所述用分离自交配后 16 天的 NMRI 小鼠的胚胎脑组织培养原代细胞。由胚胎脑切下脑半球, 通过胰酶消化分离细胞, 将单细胞悬液接种到 BioCoat®聚-L-赖氨酸包被的 96 孔板(356516, 贝克顿迪金森公司(Becton Dickinson))上, 每孔含 50 μ l 髓鞘形成培养基(myelination medium), 每孔接种 5×10^4 个细胞。髓鞘形成培养基由培养基(Bottenstein and Sato, 1979; Sadir et al., 2001)组成, 补充有 1% FCS、1%青霉素-链霉素溶液(系洛美公司(Seromed))和 10 ng/mL 重组血小板衍生生长因子 AA(PDGF-AA, R&D 系统公司(R&D Systems))。

用 LPS 处理原代混合皮质培养物：实验设定

为了设定 LPS 刺激的原代混合皮质培养物释放细胞因子, 37°C 和 10% CO₂ 培养培养物 14 天, 然后用浓度递增的 LPS(0、0.5、1、2.5、5 ng/ml)刺激 48 小时。

LPS 刺激 48 小时后, 收集 80 µl 上清液, 冻存于 -80°C, 直到进行内容物分析:

- 细胞因子释放(TNF- α 和 IL-6), 通过 CBA 小鼠炎症试剂盒(BD 生物科学公司(BD Biosciences)552364)SDF-1 进行分析

- 采用室内夹心 ELISA 设置分析 SDF-1 α , 如下所述。

- 采用 MTS 实验(普洛麦格公司(Promega)G5421; 通过形成不溶性甲臃盐测定线粒体活性的非放射性细胞增殖实验, 所述甲臃盐的形成已显示出与细胞密度相关联)评估细胞活力。

SDF-1 α ELISA

在室内进行用于定量确定混合皮质培养物中 SDF-1 α 水平的夹心 ELISA。在包被过程中, 采用 100 µl/孔的单克隆抗小鼠 SDF-1(1:500, 美国明尼阿波利斯 R&D 系统公司), 采用 100 µl/孔的生物素化多克隆抗小鼠 IgG(1:400, 美国明尼阿波利斯 R&D 系统公司)作为第二抗体, 并采用 100 µl/孔的超亲和素(extravidin)-偶联的辣根过氧化物酶(1:5000, 美国密苏里州圣路易斯的西格玛公司(Sigma, St. Louis, MO, USA))。采用重组小鼠 SDF-1(2000-10 ng/ml, 美国明尼阿波利斯 R&D 系统公司)制作标准曲线。为了观察, 采用 100 µl/孔的底物试剂, 其中包含稳定化过氧化氢和四甲基联苯胺(美国明尼阿波利斯 R&D 系统公司)的混合物。用荧光板阅读器(实验室系统多路 EX 公司(Labsystems Multiskan EX))在 450 nm 测定光密度。

SDF-1 α 和 SDF-1 α 变体对 LPS 刺激的培养物中细胞因子表达的影响

为了检测 SDF-1 α 和 SDF-1 α 变体(如 SEQ ID NO: 4 所定义)对 LPS 刺激的培养物的影响, 使细胞生长两周。在第 14 天, 在细胞与 25 µl 培养基中浓度

递增(0.001、0.1 和 10 ng/ml)的相应蛋白预培育 3 小时(37°C 和 10% CO₂)。然后将 25 µl 培养基中浓度为 5 ng/ml 的 LPS 补充给细胞, 使最终体积为 100 µl 并培育 48 小时。在第 16 天收集上清液, 通过购自 R&D 系统公司的特异性 ELISA (DuoSet 小鼠 TNF-α ELISA DY410、小鼠 IL-6 ELISA DY406)测定 TNF-α 和 IL-6(活化的小胶质细胞释放的主要细胞因子)的水平。

采用两种对照分子地塞米松和小鼠 IL-10, 它们能抑制活化小胶质细胞释放细胞因子。

数据分析

用单向 ANOVA 进行全局数据分析。还采用杜奈特检验(Dunnett's test), 将数据与“未处理细胞”作比较。显著性水平设定为 a: $p < 0.001$; b 或 **: $p < 0.01$; c 或 *: $p < 0.05$; d: $p < 0.1$ 。结果表示为平均值±平均值的标准差(s.e.m.)。

结果

试验设定

用 2.5 和 5 ng/ml 的 LPS 诱导 TNF-α、IL-6 分泌, 这两种剂量对复杂培养物无毒。此外, 各种浓度的 LPS(0、0.5、1、2.5、5 ng/ml)不会影响内源性 SDF-1α 水平(结果未显示)。

SDF-1α 和 SDF-1α 变体

结果证明, 与未处理细胞相比, 10ng/ml 的 IL-10 和地塞米松(25pM)下调了 TNF-α 和 IL-6。与未处理细胞相比, 用 LPS 刺激后, SDF-1α 和 SDF-1α 变体都能显著降低混合皮质培养物中 TNF-α 和 IL-6 的分泌水平, 最佳浓度为 10 ng/ml (图 1A 和 1B)。

结论

混合的皮质培养物构成了包括数种神经上皮细胞类型的复杂系统, 这些细胞类型包括星形细胞、小胶质细胞、神经元和少突胶质细胞。SDF-1α 的非 GAG 结合突变体 SDF-1-α 变体能以类似于 SDF-1α 的方式降低 TNF-α 和 IL-6, 这表

明 GAG 突变不影响 SDF-1 α 与其受体 CXCR4 的结合。

在 LPS 处理的混合皮质培养物中使用 SDF-1 α 和 SDF-1 α 变体时观察到的细胞因子抑制作用可能是由于 SDF-1 对小胶质细胞的直接作用或对表达 CXCR4 受体的星形细胞或神经元的间接作用。

根据临床进程, MS 可分为几种类型, 分成具有不同疾病模式的 MS 患者。罕见复发继之以疾病完全康复的患者被认为是患有良性 MS。在 85–90% MS 患者中观察到最常见的 MS 形式复发缓解型 MS(RRMS), 特征是周期性复发后恢复期存在残留的缺陷。攻击可能是由髓鞘反应性 T 细胞运输到 CNS 中引起急性炎症所致。随着时间流逝, 由复发恢复的程度降低, 神经失能(disability)基线提高。最后, 约 40% RRMS 患者不再有发作, 但发生了与慢性 CNS 炎症有关的进行性神经变性继发性疾病, 称为继发进行性 MS (SPMS)(Confavreux 等, 2000)。该疾病的这种继发进行性形式的演变与活动损伤显著较少和脑实质体积减小有关。虽然较早的 RRMS 对免疫抑制敏感, 但 SPMS 对免疫治疗的反应性降低, 甚至在后期形式中这种反应可能消失。因此, 可以假设 RRMS 和 SPMS 连为一体, 而并不是两种疾病, 早期的急性炎症导致继发性诱导神经变性过程。

MS 的原发进行性形式(PPMS)一开始的特征是不存在急性攻击, 而包括了逐步的临床下降。在临床上, 该疾病的这一形式与缺少对任何免疫治疗形式的反应相关联。我们对原发进行性多发性硬化的病理生物学机制知之甚少, 但验尸研究表明, 与炎症相比神经变性才是这些患者的主要病因。有趣的是, 灰质损伤预测了原发进行性 MS 的演化, 它是随后失能恶化的最强烈的临床奇异预测事件(Rovaris 2006)。灰质中小胶质细胞活化可能促进加速的神经元损失和脑萎缩的发展。因此, SDF-1 α 和 SDF-1 变体可能治疗原发进行性 MS, 因为它们可能调节小胶质细胞活化和神经元存活。在原发和继发 MS 形式中, 一些导致神经元损失的病理生理学机制可能重叠。

实施例 2: 在腹膜细胞征集体内模型中 SDF-1 α 变体对白细胞征集的影响

趋化因子的主要作用是控制炎症反应和免疫监视过程中特定白细胞群

体的迁移。趋化因子通过结合于七种跨膜 G 蛋白偶联受体行使其生物学作用。它们也可结合可溶性糖胺聚糖(GAG)以及细胞表面上的 GAG, 这能提高趋化因子的局部浓度, 促进其寡聚化并促进其递呈至受体。近来已证明, 体内趋化功能需要趋化因子与 GAG 的相互作用。

材料和方法

用 200 μ l NaCl (0.9%, 无 LPS)或趋化因子 4 μ g(用 200 μ l NaCl(0.9%, 无 LPS)稀释的 WT SDF-1 α 或根据 SEQ ID NO: 4 的 SDF-1 α 变体)腹膜内(i.p.)注射 8-12 周龄雌性 Balb/C 小鼠(法国 Janvier)。注射 WT 或突变的 SDF-1 α 后 4 天, 通过 CO₂ 窒息处死小鼠, 用 3 x 5ml 冰冷的 PBS 洗涤腹腔, 收集小鼠个体的全部灌洗液。用血球计数器(德国 Neubauer)对收集的总细胞计数。

结果

腹膜内注射 SDF-1 α 能征集白细胞。SDF-1 α 变体不会征集白细胞, 证明 SDF-1 α 变体中的突变丢失了体内 GAG 结合活性(见图 2)。

结论

SDF-1 α 变体(SDF-1 的 GAG 结合缺陷型突变体)在体内没有白细胞征集活性。

实施例 3: 用 EAE 脊髓(慢性)进行 SDF-1 α 定量

介绍

确定在慢性阶段用 MOG 肽诱导的患 EAE 小鼠切下的脊髓中 SDF-1 α 的表达式。实验性自身免疫脑脊髓炎(EAE)模型是鼠慢性脱髓鞘模型, 是业已建立的多发性硬化(MS)动物模型。用于诱导小鼠 EAE 的方法衍生自 Sahrbacher 等公开的方法(Sahrbacher et al., 1998)。

材料和方法

脊髓取样

疾病发病(即出现尾巴瘫痪作为临床指征)4周后,切下患 EAE 小鼠的脊髓。用冰冷的 PBS 灌注小鼠,切出脊髓,放入含有蛋白酶抑制剂混合物(罗氏分子生化制品公司(Roche Molecular Biochemicals), 1836170, 每 10 ml 缓冲液加入 1 片)的三重去污剂缓冲液(50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% NaN₃, 0.1% SDS, 1% 诺乃洗涤剂(Nonidet)P-40, 0.5% 脱氧胆酸钠)中。每毫克组织使用 100 μ l 缓冲液。将组织样品储存于 eppendorf 塑料管中, -20℃ 保存, 然后通过匀浆制备并进行分析。

分析脊髓的 SDF-1 α 含量

解冻脊髓, 在三重去污剂缓冲液中用多形件(polytron)匀浆。通过 BCA 蛋白质含量测定试剂盒(皮尔斯生物科技公司(Pierce Biotechnology), 美国罗克福德(Rockford)IL61105)定量样品中的蛋白质水平, 然后用上述实施例 1 材料和方法部分所述的 ELISA 分析 SDF-1 α 含量。

结果

图 3 显示了 EAE 慢性阶段的 EAE 动物的脊髓组织中 SDF-1 α 上调。

结论

慢性 MOG EAE 阶段的 EAE 脊髓提取物中 SDF-1 α 蛋白上调表明, 除炎症细胞征集作用外, SDF-1 α 还在神经炎症中起作用。

实施例 4: SDF-1 α 对坐骨神经粉碎诱导的神经疾病的保护性作用

介绍

进行本研究以评估用不同剂量 SDF-1 α 治疗的小鼠中的神经变性和髓鞘再生。SDF-1 α 对神经元和轴突(感觉和运动神经元)存活和再生, 或者对髓鞘形成或巨噬细胞炎症的正面作用可能导致运动功能的恢复。可按照电生理学记录评估的感觉运动功能的恢复程度确定再生情况。

材料和方法

动物

采用 30 只 8 周龄雌性 C57bl/6 RJ 小鼠(艾-简公司(Elevage Janvier), Legenet-St-Isle, 法国)。将它们分成 6 组(n=6):

- (a) 神经粉碎/载体(盐水/0.02% BSA);
- (b) 神经粉碎/SDF-1 α (3 μ g/kg);
- (c) 神经粉碎/SDF-1 α (10 μ g/kg);
- (d) 神经粉碎/SDF-1 α (30 μ g/kg);
- (e) 神经粉碎/SDF-1 α (100 μ g/kg);
- (f) 神经粉碎/IL-6 (30 μ g /kg)。

在室内分组饲养动物(每笼 6 只动物), 室内温度控制在 21-22℃, 光照-黑暗循环颠倒(12h/12h), 随意给予食物和水。按照规定的指南进行所有实验。

坐骨神经损伤

通过吸入 3%异氟烷(Isofluran)[®](巴克斯特公司(Baxter))麻醉动物。通过手术将暴露大腿中部的右侧坐骨神经, 在距离坐骨神经三根分叉部 5 mm 的地方粉碎神经。用止血钳(宽 1.5 mm; 科尼公司(Koenig); 法国斯特拉斯堡(Strasbourg; France))粉碎神经两次, 各 30 秒, 两次粉碎之间旋转 90 度。

实验计划和药理学治疗

肌电描记术(EMG)检测在手术前进行一次, 在手术后的三周内每周进行一次。

神经粉碎手术那天被认为是 dpl 0 (dpl=损伤后第 X 天)。在粉碎后 4 天内不进行检测。

从神经损伤那天到研究结束时, 每天通过皮下注射(s.c.)途径给予 SDF-1 α 、IL-6 或载体, 每周给药 5 天。

电生理学记录

用 Neuromatic 2000M 肌电描记器(EMG)(单科公司(Dantec), Les Ulis, 法国)进行电生理学记录。通过吸入 3%异氟烷(Isofluran)[®](巴克斯特公司)麻醉小

鼠。用加热的手术台(米那公司(Minerve), Esternay, 法国)维持正常体温。

以超大强度(12.8 mA)的 0.2 ms 脉冲刺激坐骨神经一次后测定腓肠肌的复合肌肉动作电位(CMAP)。测定手术腿上动作电位的幅度(mV)和潜伏期(ms)。也对载体治疗动物的对侧(未粉碎)腿进行测定(基线)。幅度表明活性运动单位的数量, 而远端潜伏期间接反映了运动神经传导情况和神经肌肉传递速度, 这部分取决于髓鞘形成的程度。

数据分析

用单向 ANOVA 进行全局数据分析。还采用杜奈特检验(Dunnett's test), 将数据与“载体”对照作比较。显著性水平设定为 a: $p < 0.001$; b 或 **: $p < 0.01$; c 或 *: $p < 0.05$; d: $p < 0.1$ 。结果表示为平均值 $\pm$ 平均值的标准差(s.e.m.)。

电生理学测定

复合肌肉动作电位的幅度(图 4A):

在载体治疗动物(基线)的对侧(粉碎)腿上观察到整个研究期间 CMAP 幅度没有显著性改变。相反, 与相应基线水平相比, 坐骨神经的破碎诱导 CMAP 幅度显著降低, 而载体治疗组在损伤后第 7 天(dpl7)和损伤后第 5 天(dpl15)下降约 80%。用 30 $\mu\text{g/kg}$ 或 $\mu\text{g/kg}$ 的 SDF-1 α 或 30 $\mu\text{g/kg}$ 的 IL-6 治疗小鼠时, 与未治疗小鼠水平相比它们的 CMAP 幅度增加(约 1.5 倍), 这种作用在 15 dpl 和 22dpl 是显著的。

复合肌肉动作电位的潜伏期(图 4B):

在整个研究期间, 在载体治疗动物的对侧(未粉碎)腿上未见 CMAP 潜伏期延长。相反, 粉碎侧的肌肉的 CMAP 潜伏期长于基线。与载体治疗小鼠相比, 在 SDF-1 α 治疗的小鼠中 CMAP 潜伏期值显著降低。在第 7 天, 用 30 $\mu\text{g/kg}$ 和 100 $\mu\text{g/kg}$ SDF-1 α 治疗后可观察到这种效果, 但用 30 $\mu\text{g/kg}$ IL-6 治疗则观察不到。在 dpl 15 和 22, 用 30 $\mu\text{g/kg}$ 和 100 $\mu\text{g/kg}$ (而非 3 或 10 $\mu\text{g/kg}$)的 SDF-1 α 仍能获得显著效果。SDF-1 α (30 $\mu\text{g/kg}$)比 IL-6 (30 $\mu\text{g/kg}$)效力更强。

结论

神经粉碎模型是非常显著的损伤性神经损伤和神经疾病外周神经疾病的模型。神经粉碎后，由于机械损伤立即损失了大多数直径较大的纤维，这导致 CMAP 幅度显著降低。CMAP 潜伏期并不立即受到影响，但在 15 天后显示出潜伏期增加，因为继发性免疫介导的变性(巨噬细胞、粒细胞)进一步造成小直径纤维变性。在损伤后第 7 天(dpl 7) CMAP 持续时间增加，在损伤后第 15 天(dpl 15)达到峰值。

外周神经粉碎后 SDF-1 α 能恢复其功能(CMAP 潜伏期)。它也显示出在小鼠神经粉碎模型中对所有测定参数具有保护作用。总之，SDF-1 α 与用于本研究的参比分子 IL-6 同样有效。

实施例 5: SDF-1 α 变体对坐骨神经粉碎诱导的神经疾病的保护作用

进行上述实施例 4 所述的坐骨神经粉碎模型，以检测如 SEQ ID NO: 4 所定义的 SDF-1 α 变体，将小鼠分成以下两组(n=6):

- (a) 手术神经粉碎/载体(盐水/0.02% BSA);
- (b) 神经粉碎/SDF-1 α 变体, 30 μ g/kg 皮下注射 (s.c.)

在载体治疗动物对侧腿上测定的结果被认为是基线值。

本实施例所用的和 SEQ ID NO: 4 编码的 SDF-1 α 变体的表达形式还含有一个 N 末端甲硫氨酸。记录 CMAP 持续时间(去极化和复极化过程所需的时间)。

结果

电生理测定

复合肌肉动作电位幅度(图 5.A):

用 SDF-1 α 变体治疗小鼠时，在损伤后第 22 天(22dpl)发现 CMAP 幅度显著提高。

复合肌肉动作电位潜伏期(图 5.B):

与载体治疗的小鼠相比，在 SDF-1 α 变体治疗的小鼠中 CMAP 潜伏期值显

著降低，尤其是在损伤后第 7 天（7 dpl）。在损伤后第 22 天（22 dpl）仍然获得正面效果。

复合肌肉动作电位的持续时间(图 5.C):

与载体治疗小鼠相比，在损伤后第 7 天（7 dpl）和损伤后第 22 天（22 dpl）SDF-1 α 变体治疗小鼠的 CMAP 持续时间值降低。

结论

外周神经粉碎后 SDF-1 α 变体能恢复其功能(CMAP 潜伏期)。也证明在外周神经粉碎后 SDF-1 α 变体能恢复其功能(CMAP 潜伏期)。它也显示出在小鼠神经粉碎模型中对所有测定参数具有保护作用。

实施例 6：Met-SDF-1 α 对坐骨神经粉碎诱导的神经疾病的保护作用

进行上述实施例 4 所述的坐骨神经粉碎模型，以检测 Met-SDF-1 α (如 SEQ ID NO: 7 所定义)，将小鼠分成以下两组(n=6):

- (a) 手术神经粉碎/载体(盐水/0.02% BSA);
- (b) 神经粉碎/Met-SDF-1 α 变体, 100、30 和 10 μ g/kg 皮下注射 (s.c.)

在载体治疗动物对侧腿上测定的结果被认为是基线值。

还记录 CMAP 持续时间(去极化和复极化过程所需的时间)。

结果

电生理测定

复合肌肉动作电位潜伏期(图 6):

与载体治疗的小鼠相比，在粉碎后第 7 天和第 14 天 Met-SDF-1 α 治疗的小鼠的 CMAP 潜伏期值显著降低。

结论

外周神经粉碎后 Met-SDF-1 α 以及 SDF-1 α 能恢复其功能(CMAP 潜伏期)。

实施例 7：SDF-1α 在糖尿病性神经疾病中的保护作用

介绍

糖尿病性神经疾病是糖尿病最常见的慢性并发症。其发病机理多种多样，可能包括高血糖以及胰岛素和 C-肽缺陷引起的数种相互关联的代谢异常。

表明糖尿病性神经疾病的最常见的早期异常是无症状的神经功能障碍，例如神经传导速度降低所反映的情况(Dyck 和 Dyck, 1999)。这些改变后通常发生足部的振动感觉丧失和踝反射丧失。电生理测定结果常常清楚地反映出准确的病因，神经传导速度的改变与神经纤维的髓鞘形成相关联(综述参见 Sima, 1994)。

链脲霉素(STZ)糖尿病大鼠是最广泛研究的糖尿病性神经疾病动物模型。它的神经血流急性下降(40%)且神经传导速度减慢(20%)(Cameron 等, 1991)，接着发生神经纤维的轴突萎缩(Jakobsen, 1976)。在长期糖尿病中观察到脱髓鞘和退化的有髓纤维以及轴-胶质分离(Sima 等, 1988)。

本研究的主要目的是研究 SDF-1α 对 STZ-大鼠的糖尿病性神经疾病的形成可能产生的神经-和胶质-保护作用。

材料和方法

动物

将 8 周龄雄性 Sprague Dawley 大鼠(Janvier, Legenet Saint Isle, 法国)随机分成 6 个实验组(n=10)，如下所述。

表 IV

组别(n=10)	治疗	给药途径	治疗时间 (给予 STZ 后天数)
对照/载体	每天给予载体	s.c.	11-40
STZ/载体	每天给予载体	s.c.	11-40
STZ/ SDF-1α (10 μg/kg)	每天给予 SDF-1α	s.c.	11-40
STZ/ SDF-1α(30 μg/kg)	每天给予 SDF-1α	s.c.	11-40
STZ/SDF-1α (100 μg/kg)	每天给予 SDF-1α	s.c.	11-40
STZ/IL-6 (10 μg/kg)	每天给予 IL-6	s.c.	11-40

在室内分组饲养动物(每笼 3 只动物)，室内温度控制在 21-22℃，光照-黑暗循环颠倒(12h/12h)，随意给予食物和水。按照规定的指南进行所有实验。

诱导糖尿病和药理学治疗

通过静脉内注射剂量为 55 mg/kg 的链脲霉素(西格玛公司(Sigma), L'Isle d'Abeau Chesnes, 法国)缓冲溶液诱导糖尿病。用 0.1 mol/l 柠檬酸盐缓冲液 pH 4.5 中制备 STZ。对照组接受等体积的柠檬酸盐缓冲液。将 STZ 注射日认定为 D0。

给予 STZ 后 D10, 监测各个动物的高血糖情况。该研究排除血糖值低于 260 mg/dl 的动物。

从 D11 至 D40, 每天用 SDF-1 α 、IL-6 或其匹配载体治疗。

用含 0.02% BSA 的盐水溶液(0.9% NaCl)制备 SDF-1 α 和 IL-6。

实验计划

- 第-7 天: 基线(EMG)
- 第 0 天: 用链脲霉素诱导
- 第 7 天: 监测高血糖
- 第 11 天: 开始治疗
- 第 20 天: 凡-夫雷检测(Von Frey test)
- 第 25 天: 监测 EMG
- 第 40 天: 监测 EMG 和 HP 52°C 检测
- 第 41 天: 取得坐骨神经和皮肤活检样品进行组织形态分析。

肌电描记术

利用肌电描记器(关键点(Keypoint), 麦特尼公司(Medtronic), Boulogne-Billancourt, 法国)进行电生理学记录。通过腹膜内注射(IP) 60 mg/kg 盐酸氯胺酮(Imalgène 500[®], Rhône Mérieux, 法国里昂)和 4 mg/kg 赛拉嗪(甲苯噻嗪 2%, 拜耳制药公司(Bayer Pharma), 德国基尔(Kiel))麻醉大鼠。用加热灯将正常体温维持在 30°C, 通过安置在尾巴表面的接触式温度计(奎克(Quick), 生物模块科学公司(Bioblock Scientific), Illkirch, 法国)进行控制。

刺激坐骨神经后, 记录腓肠肌的复合肌肉动作电位(CMAP)。将参比电极和有源针头接入后爪。将接地针头插入大鼠的下背。以超大强度的 0.2 ms 脉

冲刺激坐骨神经一次。记录运动波的速度。

也记录感觉神经传导速度(SNCV)。尾部皮肤电极的安置如下：将参比电极插入尾巴根部，将阳极针头安置在尾末端方向上距离参比针头 30 mm 的地方。将接地针头电极插入阳极和参比针头之间。用 20 个强度为 12.8 mA 的脉冲(0.2 ms)连续刺激尾部神经。速度以 m/s 计算。

形态学分析

在研究结束时进行形态学分析。通过腹腔内(IP)注射 60 mg/kg Imalgène 500[®]麻醉动物。剪下 5 mm 的坐骨神经段进行组织学分析。用磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)配制的 4%戊二醛(西格玛公司, L'Isle d'Abeau-Chesnes, 法国)溶液固定组织过夜, 保持在 30%蔗糖溶液中+4℃待用。用磷酸盐缓冲溶液配制的 2% 四氧化锇(西格玛公司)溶液固定神经样品 2 小时, 用连续乙醇溶液脱水, 包埋在环氧树脂(Epon)中。然后, 将包埋组织置于+70℃聚合 3 天。用超薄切片机获得 1.5 μm 厚的横截面切片。用 1%甲苯胺蓝溶液(西格玛公司)染色 2 分钟, 脱水, 安装在 Eukitt 中。

用半自动的数字图像分析软件(Biocom, 法国)在整个神经切片表面上进行分析。一旦清除了外来对象, 该软件能报道出有髓鞘纤维的总数。然后由操作者对变性纤维的数量进行手工计数。无轴突的有髓鞘纤维、多余髓鞘(myelin)和相对于轴突直径鞘厚度太大的纤维都被认为是发生了变性过程的纤维。通过减去变性纤维的数目得到非变性纤维的数目。

只对认为是非变性纤维的纤维进行形态学分析。在各纤维中, 以表面积(μm²)表示轴突和髓鞘尺寸。用这两个参数计算各纤维 g-比例(轴突直径/纤维直径)的当量面积(即 $[A/(A+M)]^{0.5}$, A=轴突面积, M=髓鞘面积), 其说明了相对髓鞘厚度。

此外, 从后爪上切取 5-10 mm 直径面积的皮肤活检样品。立即用多聚甲醛将皮肤样品 4℃固定过夜, 在 0.1 M PBS 配制的 30%蔗糖溶液中培育(过夜), 以进行冷冻保护, 包埋在 OCT 中, 冻存于-80℃, 直到进行冰冻切片。

然后, 用低温恒温器以垂直于皮肤表面的方向切割 50 μm 厚的冰冻切片。在兔抗蛋白基因产物 9.5 (1:10000; 超克隆公司(Ultraclone), 英国曼恩岛(Isle of Man))中 4℃培育自由浮动的切片 7 天。然后按照 ABC 过氧化物酶法加工切

片,以揭示免疫反应性。简要说,用生物素化的抗山羊抗体(1:200)培育它们 1 小时,然后在亲和素(avidin)生物素化的复合物中室温培育 30 分钟。用 DAB 系统观察过氧化物酶活性。然后用伊红或苏木精复染切片。使切片脱水,用生物清净剂(bioclear)清洁,安装在 eukitt 上。用尼康(Nikon)数码相机(焦距为 12.9 mm)以 20×倍放大观察获得显微镜视野照片。实验人员在计算机显示器上,对 3 个 $0.22\ \mu\text{m}^2$ ($544\times 408\ \mu\text{m}$)的显微镜视野上的表皮内神经数目分别计数。

数据分析

采用单因子或重复测定方差分析(ANOVA)和单向 ANOVA 进行全局数据分析。当 ANOVA 说明存在显著性差异时,用费舍尔保护的最小显著性差异(Fisher Protected Least Significant Difference)作为因果检验,来比较实验组与载体治疗的糖尿病大鼠组。显著性水平设定为 $p\leq 0.05$ 。结果表示为平均值 $\pm$ 平均值的标准差(s.e.m.)。

结果

体重

与显示出逐步生长的非糖尿病大鼠相反,糖尿病大鼠的生长显然受阻(图 7A)。

与载体治疗的糖尿病大鼠相比,SDF-1 α 或 IL-6 治疗与轻微而非显著的体重增加相关。

高血糖

在给予 STZ 后第 7 天,接受 STZ 的所有大鼠的高血糖水平比对照大鼠高 5 倍(图 7B)。

电生理学测定

1. 化合物肌肉动作电位的潜伏期

与非糖尿病大鼠相比,在 D25 糖尿病大鼠的 CMAP 潜伏期显著延长(图 7C)。与载体治疗的糖尿病大鼠相比,SDF-1 α 或 IL-6 治疗能诱导糖尿病大鼠的 CMAP 潜伏期显著下降。

在给予 STZ 后 D40 观察到相似结果。

2. 感觉神经传导速度

在 D25, 与非糖尿病大鼠相比, 载体治疗的糖尿病大鼠的 SNCV 显著降低(图 7D)。SDF-1 α 或 IL-6 治疗能显著改善糖尿病大鼠的 SNCV 性能。治疗剂量 10 和 30 $\mu\text{g/kg}$ 时观察到最佳效果, 与 IL-6 治疗的效果相当。

在给予 STZ 后 D40 观察到相似结果。

形态学分析

1. g-比例(相对髓鞘厚度)

接受载体的糖尿病大鼠的 g-比例显著高于非糖尿病大鼠(图 7E), 这表明糖尿病大鼠的髓鞘变薄。与 STZ/载体组相比, 尤其是剂量为 10 或 30 $\mu\text{g/kg}$ 时, 用 SDF-1 α 治疗糖尿病大鼠能显著降低 g-比例。剂量为 100 $\mu\text{g/kg}$ 时, g-比值的降低不会达到显著性水平。

IL-6 治疗也诱导 g-比值的显著降低。

2. 变性纤维数目

接受载体的糖尿病大鼠的变性纤维比例显著高于非糖尿病大鼠(图 7F)。相反, 糖尿病大鼠的非变性纤维的比例显著低于非糖尿病大鼠(图 7F)。用 SDF-1 α 治疗糖尿病大鼠能减少变性纤维群体。最佳效果与使用的最低剂量(10 $\mu\text{g/kg}$)相关, 达到了显著性水平。

也在 IL-6 治疗的糖尿病大鼠中观察到变性纤维群体显著减少。

如图 7G 所示, 接受载体的糖尿病大鼠表皮内神经纤维的密度显著低于非糖尿病大鼠。用 SDF-1 α 治疗糖尿病大鼠皮肤神经纤维的密度显著高于载体治疗组。观察到的效果与 IL-6 治疗组相当。

结论

在本研究中, 我们希望评估 SDF-1 α 对发生糖尿病相关性神经疾病的神经和胶质细胞-保护作用。在 STZ 诱导的糖尿病相关神经疾病患病大鼠中进行研究。与糖尿病性神经疾病的临床情况类似, 早至给予 STZ 后第 7 天就检测到的

感觉神经传导受损是表明该模型中发生神经疾病的最早迹象，这与后来观察到的脱髓鞘和/或轴突变性的证据(Andriambeloson 等, 2006)相一致。以前的研究证明，用低剂量 IL-6 治疗 STZ 大鼠阻碍了此模型中神经疾病的进展，而不干扰高血糖的发生(Andriambeloson 等, 2006)。

在本研究中，我们发现慢性给予 SDF-1 α (10、30 和 100 $\mu\text{g/kg}$)能在治疗约 2 周内改善糖尿病大鼠的感觉运动性能(SNCV 和 CMAP 潜伏期评分)。治疗剂量为 10 或 30 $\mu\text{g/kg}$ 时获得最佳效果，与 10 $\mu\text{g/kg}$ IL-6 的效率相当。此外，发现以这些剂量进行 SDF-1 α 治疗能显著防止与此模型有关的髓鞘丧失。因为髓鞘质量是优化神经传导的重要因素，所以保持髓鞘的大小实际上可能部分解释接受 SDF-1 α 治疗的糖尿病大鼠的神经功能改善。而且，也观察到 SDF-1 α 能减少坐骨神经中发生轴突变性的纤维群体。

与神经疾病的存在和严重程度与皮肤活检样品的表皮内神经纤维变性相关联的糖尿病性神经疾病的临床情况相似(Herrmann 等, 1999; Smith 等, 2001)，STZ 诱导的大鼠糖尿病性神经疾病也显示出此种动物模型的神经疾病临床迹象与表皮内神经纤维密度降低紧密相关。与上述发现相一致的是，本研究证明，载体治疗的糖尿病大鼠显示出表皮内神经纤维密度显著降低。通过 SDF-1 α 或 IL-6 治疗能大大防止这一现象，因此进一步支持了在糖尿病诱导的神经损伤中 SDF-1 α 的神经保护作用。

总之，上述发现表明了 SDF-1 α 治疗在糖尿病性神经疾病大鼠模型中的神经保护作用。SDF-1 α 是临床糖尿病性神经疾病治疗方案的开发中令人感兴趣的候选物。

实施例 8：SDF-1 α 在神经性疼痛中的保护作用

介绍

神经性疼痛的最常见的病因(precipitating cause)是糖尿病，特别是血糖控制力差的糖尿病。约 2-24%糖尿病患者发生神经性疼痛。糖尿病性神经性疼痛可能在接触正常轻微疼痛刺激后自发性发生(即痛觉过敏)，或者经过通常不会感受为疼痛的刺激后发生(即异常性疼痛)。在链脲霉素模型中，糖尿病早期出现许多疼痛感知异常(Hounsom 和 Tomlinson, 1997)。例如，与对照动物相比，

在 STZ 大鼠中福尔马林诱发的畏缩被放大。此外，报道了此种糖尿病动物模型中发生触觉异常性疼痛(Calcutt 等，1995，1996)。在高血糖持续出现的晚期(Bianchi 等，2004)，热板阈值延长被报道为糖尿病大鼠的行为异常。

材料和方法

动物

将 8 周龄雄性 Sprague Dawley 大鼠(Janvier, Legenet Saint Isle, 法国)随机分成 6 个实验组(n=10)，如下所述。

表 V

组别(n=10)	治疗	给药途径	治疗时间 (给予 STZ 后天数)
对照/载体	每天给予载体	s.c.	11-40
STZ/载体	每天给予载体	s.c.	11-40
STZ/ SDF-1 α (10 μ g/kg)	每天给予 SDF-1 α	s.c.	11-40
STZ/ SDF-1 α (30 μ g/kg)	每天给予 SDF-1 α	s.c.	11-40
STZ/ SDF-1 α (100 μ g/kg)	每天给予 SDF-1 α	s.c.	11-40
STZ/IL-6 (10 μ g/kg)	每天给予 IL-6	s.c.	11-40

在室内分组饲养动物(每笼 3 只动物)，室内温度控制在 21-22℃，光照-黑暗循环颠倒(12h/12h)，随意给予食物和水。按照规定的指南进行所有实验。

诱导糖尿病和药理学治疗

通过静脉内注射剂量为 55 mg/kg 的链脲霉素(西格玛公司(Sigma), L’Isle d’Abeau Chesnes, 法国)缓冲溶液诱导糖尿病。在 0.1 mol/l 柠檬酸盐缓冲液 pH 4.5 中制备 STZ。对照组接受等体积的柠檬酸盐缓冲液。将 STZ 注射日认定为 D0。

给予 STZ 后 D10，监测各个动物的高血糖情况。该研究排除血糖值低于 260 mg/dl 的动物。

从 D11 至 D40，每天用 SDF-1 α 、IL-6 或其匹配载体治疗。

用含 0.02% BSA 的盐水溶液(0.9% NaCl)制备 SDF-1 α 和 IL-6。

实验计划

-第 0 天：用链脲霉素诱导

- 第 7 天：监测高血糖
- 第 11 天：开始治疗
- 第 20 天：凡-夫雷检测(Von Frey test)
- 第 40 天：监测 EMG 和 HP 52℃检测

凡-夫雷丝线检测

将大鼠放在金属网格地面上。通过网格地面插入凡-夫雷丝线(Bioseb, 法国)并且将其施加到后爪趾面, 从而进行伤害性监测。试验由数次施加不同的凡-夫雷丝线(频率为 1-1.5 秒)组成。施加凡-夫雷丝线(的压力)是 10 g-180 g 丝线。将使得后爪迅速缩回的压力认定为阈值。将截止值设定为 180 g。

热板 52℃检测

将动物放入调整为 52℃的热板上玻璃圆柱体中。记录第一个反应的潜伏期(舔、爪迅速移动、小跳或跳离热板), 截止时间为 30 秒。

结果

凡-夫雷丝线

在凡-夫雷检测中, 给予 STZ 后第 20 天, 载体治疗的糖尿病大鼠的阈值显著低于非糖尿病大鼠(图 8A)。

与载体治疗的糖尿病大鼠的评分相比, SDF-1 α 或 IL-6 治疗能诱导糖尿病大鼠阈值显著提高。SDF-1 α 或 IL-6 治疗大鼠的阈值与非糖尿病大鼠没有统计学差异。

热板 52℃检测

在热板检测中, 在给予 STZ 后 D40, 接受载体治疗的糖尿病大鼠的阈值潜伏期显著高于非糖尿病大鼠(图 8B)。

用 SDF-1 α 或 IL-6 治疗糖尿病大鼠能将糖尿病大鼠的阈值潜伏期显著降低到与非糖尿病大鼠统计学相当的水平。

结论

分别在D20和D40评估响应于凡-夫雷丝线(机械刺激)和热(52℃)的大鼠行为。在这两组检测中,与载体治疗的大鼠相比,用SDF-1 α 治疗的糖尿病大鼠的行为明显不同,它们的评分变得与非糖尿病大鼠相当。

这些结果似乎与电生理学和组织学结果相一致,这表明SDF-1 α 也可在神经性疼痛中起保护作用。

实施例 9: SDF-1 基因与原发进行性 MS 的遗传关联

材料和方法

收集患者和对照

该研究包括收集一次与原发进行性MS(MSP)不相关的患者。该研究中的所有对象都是来自意大利的高加索人。弃去来自撒丁岛的患者和对照。

我们囊括了在疾病进程中的197名患者。其中141名的神经症状相对于疾病开始时有所进展,但没有复发(原发进行性);39名具有重叠有复发的进行性病程(进行性复发);17名具有单独攻击后许多年开始的进行性病程(单攻击进行性)。对照群体包括234名无关的健康对照,它们与病例群体的人种背景相同。

病例组的性别比为1.05(101名女性和96名男性),平均年龄为39.2 [19-65]岁。对照组包括234名对象,性别比为1.03 (119名女性和115名男性),平均年龄为40.4 [19-70]岁。

基因分型

全基因组分析的方法:阿非美科法(Affymetrix method)

用10单位Nsp I和Sty I限制性酶(马萨诸塞州贝弗利(Beverly, MA)的新英格兰生物实验室公司(New England Biolabs)) 37℃平行消化250 ng (5 μ l)来自各样品的DNA 2小时。然后,用T4 DNA连接酶于16℃处理3小时,从而将酶特异性衔接头寡核苷酸连接到消化末端上。用水稀释后,用5 μ l稀释的连接反应液进行PCR。在25 μ M PCR引物002 (阿非美科公司(Affymetrix))、350 μ M各dNTP、1M甜菜碱(俄亥俄州克利夫兰(Cleveland, OH)的USB公司)和1X钛(Titanium)Taq PCR缓冲液(BD生物科学公司(BD

Biosciences))存在下,用钛(Titanium)Taq DNA 聚合酶(加州圣荷塞(San Jose)的 BD 生物科学公司)进行 PCR。循环参数如下,最初于 94℃变性 3 分钟;扩增:94℃ 30 秒、60℃ 30 秒和 68℃延伸 15 秒,共重复 30 次;最后于 68℃延伸 7 分钟。合并三次反应的 PCR 产物,按照生产商说明用 MinElute 96-孔 UF PCR 纯化板(加州巴伦西亚(Valencia, CA)的凯杰公司(Qiagen))进行纯化。将样品收集到微量离心管中,16,000 x g 离心 10 分钟。

回收管中的离心产物,特别小心不要破坏白色凝胶状的磷酸镁沉淀。然后用 2% TAE 凝胶电泳验证 PCR 产物(迁移到平均大小为 200-800 bps 的地方)。用 0.25 单位 DNA 酶 I 于 37℃处理 35 分钟,以便使 60 微克纯化 PCR 产物片段化。经 2%TAE 凝胶电泳验证,完全片段化的产物的平均大小小于 180 bps。片段化后,用 105 单位的末端脱氧核苷酸转移酶于 37℃末端标记 DNA 2 小时。然后,于 49℃ 60 rpm 处理 18 小时以使标记的 DNA 杂交到各个孟德尔整列上。按照生产商(阿非美科公司)说明,洗涤、染色和扫描杂交阵列。

用 DM 算法在 p 值为 0.33 情况下获得基因型调用(genotype call),然后按照阿非美科公司说明书用 BRLMM 算法进行分批分析。

SNP 过滤

用以下标准过滤 SNP:

- 基因型丢失速率必须<5%
- 在对照中最小等位基因频率(MAF)必须>1%
- 在对照中不处于哈-温平衡的概率必须<2%
- 在病例中 SNP 必须有多态性

只保留常染色体的 SNP 进行分析

统计学分析

方法:

采用以下单变量检验(采用准确检验和皮尔森统计(Pearson's statistic))以 10,000 种排列评估各群体的 FDR(假发现率):

- 等位基因检验

- 基因型检验
- 等位基因和基因型检验的最小值(缩写为‘min’)
- 等位基因和基因型检验的最大值(缩写为‘max’)

结果

SNP 过滤和基因组覆盖

应用上述过滤标准能减少剩余 SNP 的数量，如表 VI 所示：

表 VI

扫描	SNP 总数	过滤后的 SNP 数量	剩余%
MSPP 病例与 MS 对照	497,641	323,664	65 %

FDR

FDR 结果见图 9

FDR 阈值为 10%时，选择的 SNP 和基因如表 VII 所示。

表 VII

扫描	#SNP	#BIN	#基因	#丢弃(deserts)
MSPP 与对照	78	72	62	10

选择了 SDF-1(CXCL2)基因中的一个 SNP(SNP_A-2185631)(见图 10.)

观察列联表，我们可以观察到这种关联性来源于病例和对照群体中等位基因 C 的分布差异。

表 VIII

基因型	MSPP 与对照	
	病例	对照
CC	2.2%	0.0%
CG	22.8%	7.4%
GG	75.0%	92.6%

在此 SNP 周围区域进行的详细生物分析显示，它位于最近发现的 SDF-1 新同工型的内含子中，如下所述：

按照只鉴定了两种同工型 SDF-1 α 和 SDF-1 β 的 Ensembl，SNP_A-2185631 位于 SDF-1(也称为 CXCL12)基因下游 25kb 处。没有基因

更接近 SNP_A-2185631。

SDF-1 位于染色体 10(44,192,517-44,200,551, NCBI 版本 35)上, 跨越 8kb。

对基因组序列进行注释, 以便了解 SNP_A-2185631 是否可能与 SDF-1 基因或另一附近基因相关联。

在序列数据库中, 发现了 Ensembl 中没有描述的剪接变体: SDF-1 γ 、SDF-1 δ 、SDF-1 ϵ 和 SDF-1 ϕ 。所有间接变体的前三个外显子相同。SDF-1 ϵ 和 SDF-1 ϕ 的最后一个外显子位于下游 72 kb 处(见图 11)。“美国印第安纳波利斯(Indianapolis, IN 46285)礼来公司(Eli Lilly and Company)的心血管科、癌症科和综合生物学处的礼来研究实验室(Lilly Research Laboratories)”于 2006 年 6 月将这些新序列提交给 NCBI。编码这两种同工型的 cDNA(DQ345520 和 DQ345519)含有规范剪接位点、聚腺苷酸化信号和聚 A 尾(在基因组序列未发现)。

因为所有剪接变体的前三个外显子相同, 所以这 6 种同工型的 N 末端部分(88 个氨基酸)均相同。

因此, 对 SNP_A-2185631 周围区域进行的详细生物学分析显示:

- SDF-1 基因比预计长: 是 87 kb, 而非 8kb

- 感兴趣 SNP(SNP_A-2185631)在 SDF-1 基因中, 位于 SDF-1 ϵ 和 SDF-1 ϕ 的最后一个内含子中(见图 12)。

因此得出结论, SDF-1 基因与原发进行性 MS 相关。

参考文献

1. Andriambeloson, E., Baillet, C., Vitte, P.A., Garotta, G., Dreano, M., Callizot, N. (2006) Interleukin-6 attenuates the development of experimental diabetes-related neuropathy(白介素-6 削弱实验性糖尿病相关神经疾病的发展). *Neuropathology*. 26, 32-42。

2. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. 和 Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool(基础本地比对搜索工具), *J. Mol. Biol.* 215, 403-410。

3. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z.,

Miller,W.和 Lipman,D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs (缺口 BLAST 和 PSI-BLAST: 新一代蛋白质数据库搜索程序). *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402。

4. Amara,A., Lorthioir,O., Valenzuela,A., Magerus,A., Thelen,M., Montes,M., Virelizier,J.L., Delepierre,M., Baleux,F., Lortat-Jacob,H. 和 Arenzana-Seisdedos,F. (1999). Stromal cell-derived factor-1 alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine(间质细胞衍生因子 1 α 通过趋化因子第一 β 链连接于硫酸乙酰肝素). *J Biol Chem* 274, 23916-23925。

5. Ambrosini,E., Remoli,M.E., Giacomini,E., Rosicarelli,B., Serafini,B., Lande,R., Aloisi,F. 和 Coccia,E.M. (2005). Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions (在体外及多发性硬化症损伤中星型细胞产生吸引树突细胞的趋化因子). *J Neuropathol. Exp Neurol.* 64, 706-715。

6. Bajetto,A., Bonavia,R., Barbero,S., Florio,T.和 Schettini,G. (2001). Chemokines and their receptors in the central nervous system(中枢神经系统中的趋化因子及其受体). *Front Neuroendocrinol.* 22, 147-184。

7. Bezzi,P., Domercq,M., Brambilla,L., Galli,R., Schols,D., De Clercq,E., Vescovi,A., Bagetta,G., Kollias,G., Meldolesi,J. 和 Volterra,A. (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF alpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity(CXCR-4 活化的星型细胞通过 TNF α 释放谷氨酸: 通过小胶质细胞放大触发神经毒性). *Nat Neurosci* 4, 702-710。

8. Bianchi, R., Buyukakilli, B., Brines, M., Savino, C., Cavaletti, G., Oggioni, N., Lauria, G., Borgna, M., Lombardi, R., Cimen, B., Comelekoglu, U., Kanik, A., Tataroglu, C., Cerami, A., Ghezzi, P. (2004) Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy(红细胞生成素保护并逆转实验性糖尿病性神经疾病). *Proc Natl Acad Sci USA.* 101,823-828。

9. Bottenstein,J.E.和 Sato,G.H. (1979). Growth of a rat neuroblastoma cell

line in serum-free supplemented medium(在无血清培养基中培养一种大鼠神经母细胞瘤细胞系). *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 514-517。

10. Calcutt, N.A., Jorge, M.C., Yaksh, T.L., Chaplan, S.R. (1996) Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine (链脲霉素糖尿病大鼠的触觉异常性疼痛和福尔马林痛觉过敏: 胰岛素、醛糖还原酶抑制和利多卡因的作用) *Pain* 68, 293-9。

11. Calcutt N.A., Li L, Yaksh, T.L., Malmberg, A.B.(1995) Different effects of two aldose reductase inhibitors on nociception and prostaglandin (两种醛糖还原酶抑制剂对伤害感受和前列腺素的不同作用). *E. Eur. J. Pharmacol.* 285, 189-197。

12. Cameron N.E., Cotter M.A., Low P.A. (1991) Nerve blood flow in early experimental diabetes in rats: relation to conduction deficits. (大鼠早期实验性糖尿病中的神经血流: 与传导缺陷的关系). *Am. J. Physiol* 261, E1-8。

13. Consilvio, C., Vincent, A.M. 和 Feldman, E.L. (2004). Neuroinflammation, COX-2, and ALS--a dual role? (神经炎症, COX-2 和 ALS-双重角色?). *Exp Neurol.* 187, 1-10。

14. Devereux, J., Haerberli, P. 和 Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX(一种全面的 VAX 序列分析程序组). *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395。

15. Dyck, P.J.B., Dyck, P.J. (1999). Diabetic polyneuropathy(糖尿病性多神经疾病), 刊于 *Diabetic Neuropathy*(糖尿病性神经疾病), Dyck PJ, Thomas PK (编), Saunders WB: Philadelphia, PA, 255-278。

16. Eikelenboom, P., Bate, C., Van Gool, W.A., Hoozemans, J.J., Rozemuller, J.M., Veerhuis, R. 和 Williams, A. (2002). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. (阿尔茨海默病和朊病毒疾病的神经炎症). *Glia* 40, 232-239。

17. Gao, H.M., Liu, B., Zhang, W. 和 Hong, J.S. (2003). Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease(帕金森病的新型抗炎疗法)。

Trends Pharmacol Sci 24, 395-401。

18. Gleichmann,M. , Gillen,C. , Czardybon,M. , Bosse,F. , Greiner-Petter,R., Auer,J.和 Muller,H.W.(2000). Cloning and characterization of SDF-1 gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system(克隆并鉴定 SDF-1 γ , 一种在神经系统中进行发育调节表达的新型 SDF-1 趋化因子转录物). Eur J Neurosci 12, 1857-1866。

19. Grantham,R. (1974). Amino acid difference formula to help explain protein evolution(氨基酸差异公式有助于解释蛋白质进化). Science 185, 862-864。

20. Hesselgesser,J., Taub,D., Baskar,P., Greenberg, M., Hoxie,J., Kolson,D.L.和 Horuk,R.(1998). Neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 and the chemokine SDF-1 alpha is mediated by the chemokine receptor CXCR4 (HIV-1 gp120 和趋化因子 SDF-1 α 诱导的神经元凋亡由趋化因子受体 CXCR4 介导). Curr Biol 8, 595-598。

21. Hoogewerf,A.J. , Kuschert,G.S. , Proudfoot,A.E. , Borlat,F. , Clark-Lewis,I., Power,C.A.和 Wells,T.N.(1997). Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines(糖胺聚糖介导细胞表面趋化因子的寡聚化). Biochemistry 36, 13570-13578。

22. Hunter,C.L., Bachman,D.和 Granholm,A.C.(2004). Minocycline prevents cholinergic loss in a mouse model of Down's syndrome (在唐氏综合症小鼠模型中米诺环素抑制胆碱能损失). Ann. Neurol. 56, 675-688。

23. Infante,J. , Llorca,J. , Berciano,J. 和 Combarros,O. (2005). Interleukin-8, intercellular adhesion molecule-1 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms and the risk for multiple system atrophy (白介素-8、胞间黏着分子-1 和肿瘤坏死因子 α 基因多态性及多系统萎缩的风险). J Neurol. Sci 228, 11-13。

24. Jakobsen , J. (1976) Axonal dwindling in early experimental diabetes. II. A study of isolated nerve fibres (早期实验性II型糖尿病的轴突缩

小. 分离神经纤维的研究). *Diabetologia* 12, 547-553。

25. Jiang,Y. , Salafranca,M.N. , Adhikari,S. , Xia,Y. , Feng,L. , Sonntag,M.K. , deFiebre,C.M. , Pennell,N.A. , Streit,W.J.和 Harrison,J.K.(1998). Chemokine receptor expression in cultured glia and rat experimental allergic encephalomyelitis (培养神经胶质细胞及大鼠试验性变应性脑脊髓炎中趋化因子受体的表达). *J Neuroimmunol.* 86, 1-12。

26. Lazarini,F. , Tham,T.N. , Casanova,P. , Arenzana-Seisdedos,F.和 Dubois-Dalcq,M. (2003). Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system (α 趋化因子间质细胞衍生因子(SDF-1)在中枢神经细胞发育和成熟中的作用). *Glia* 42, 139-148。

27. Lehnardt,S. , Lachance,C. , Patrizi,S. , Lefebvre,S. , Follett,P.L. , Jensen,F.E. , Rosenberg,P.A. , Volpe,J.J.和 Vartanian,T. (2002). The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS(脂多糖诱导的 CNS 少突胶质细胞损伤需要 Toll 样受体 TLR4). *J Neurosci* 22, 2478-2486。

28. Lehnardt,S. , Massillon,L. , Follett,P. , Jensen,F.E. , Ratan,R. , Rosenberg,P.A. , Volpe,J.J. 和 Vartanian,T. (2003). Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway (CNS 先天免疫性的激活通过 Toll 样受体 4 依赖通路触发神经变性). *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 8514-8519。

29. Ma,Q. , Jones,D. , Borghesani,P.R. , Segal,R.A. , Nagasawa,T. , Kishimoto,T. , Bronson,R.T.和 Springer,T.A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in C (C 中受损的 B-淋巴细胞增殖、骨髓组织生成和脱开的小脑神经元迁移). *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9448-9453。

30. Noseworthy,J.H. (1999). Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis (确定多发性硬化的病因和治疗方法的进展). *Nature* 399, A40-A47。

31. Panenka,W., Jijon,H., Herx,L.M., Armstrong,J.N., Feighan,D., Wei,T., Yong,V.W., Ransohoff,R.M.和 MacVicar,B.A. (2001). P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase (星形细胞中 P2X7 样受体激活能通过促分裂原活化蛋白质激酶提高趋化因子单核细胞化学引诱蛋白-1 的表达). *J Neurosci* 21, 7135-7142。

32. Pearson,W.R. (1990). Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA (用 FASTP 和 FASTA 进行快速和灵敏的序列比较). *Methods Enzymol.* 183, 63-98。

33. Pearson,W.R.和 Lipman,D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison (用于生物序列比较的改进工具). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85, 2444-2448。

34. Perry,V.H. (2004). The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease (全身炎症对脑部炎症的影响: 慢性神经变性疾病的并发症). *Brain Behav. Immun.* 18, 407-413。

35. Phizicky,E.M. 和 Fields,S.(1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis(蛋白质-蛋白质相互作用: 检测和分析的方法). *Microbiol. Rev* 59, 94-123。

36. Robinson,S., Tani,M., Strieter,R.M., Ransohoff,R.M.和 Miller,R.H. (1998). The chemokine growth-regulated oncogene-alpha promotes spinal cord oligodendrocyte precursor proliferation (趋化因子生长调节性癌基因- α 促进脊髓少突胶质细胞前体增殖). *J Neurosci* 18, 10457-10463。

37. Rovaris, M., Judica, E., Gallo,A., Benedettim B., Sormani, M.P., Caputo, D., Ghezzi, A., Montanari, E., Bertoolotto, A., Mancardi, G., Bergamaschi, R., Mrtinelli, V., Comi, G., Filippi, M. (2006) Grey matter damage predicts the evolution of primary progressive multiple sclerosis at 5 years (灰质损伤预测了 5 年后原发进行性多发性硬化的演化). *Brain*, 8 月 18 日, 1-7。

38. Sadir,R., Baleux,F., Grosdidier,A., Imberty,A.和 Lortat-Jacob,H. (2001). Characterization of the stromal cell-derived factor-1 α -heparin complex (间质细胞衍生因子-1 α -肝素复合物的鉴定). *J Biol Chem* 276, 8288-8296。

39. Sahrbacher,U.C., Lechner,F., Eugster,H.P., Frei,K., Lassmann,H. 和 Fontana,A. (1998). Mice with an inactivation of the inducible nitric oxide synthase gene are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis (诱导型氮氧化物合酶基因失活的小鼠易患实验性自身免疫脑脊髓炎). *Eur J Immunol* 28, 1332-1338。

40. Schwarz,M.K.和 Wells,T.N. (1999). Interfering with chemokine networks--the hope for new therapeutics (干扰趋化因子网络-新型治疗的希望). *Curr Opin Chem Biol* 3, 407-417。

41. Sima, A. A., Nathaniel, V., Bril V., McEwen T.A., Greene D.A. (1988) Histopathological heterogeneity of neuropathy in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes, and demonstration of axo-glial dysjunction in human diabetic neuropathy (胰岛素依赖性和非胰岛素依赖性糖尿病中神经疾病的组治病理学复杂性以及人糖尿病性神经疾病中的轴突-胶质细胞分离). *J. Clin. Invest* 81, 349-364。

42. Sima A.A.(1994) Pathological definition and evaluation of diabetic neuropathy and clinical correlations (糖尿病性神经疾病的病理学定义和评价以及临床相关性. *Can. J. Neurol. Sci.* 21,S13-17。

43. Smith,T.F.和 Waterman,M.S. (1981). Identification of common molecular subsequences (鉴定常见的分子亚序列). *J. Mol. Biol.* 147, 195-197。

44. Sorensen,T.L., Trebst,C., Kivisakk,P., Klaege,K.L., Majmudar,A., Ravid,R. , Lassmann,H. , Olsen,D.B. , Strieter,R.M. , Ransohoff,R.M. 和 Sellebjerg,F.(2002). Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system (多发性硬化: 在中枢神经系统炎症中 CXCL10 和 CXCR3 共同定位的研究). *J Neuroimmunol.* 127,

59-68。

45. Stoll,G. , Jander,S. 和 Myers,R.R. (2002). Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation (周围神经系统的变性和再生: 来自 Augustus Waller 对神经炎症的观察). *J Peripher. Nerv. Syst.* 7, 13-27。

46. Stumm,R.K., Rummel,J., Junker,V., Culmsee,C., Pfeiffer,M., Krieglstein,J., Holtt,V.和 Schulz,S. (2002). A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia (SDF-1/CXCR4 趋化因子受体系统在成人脑中的双重作用: SDF-1 表达的同工型选择性调节能在病灶缺血后调节 CXCR4 依赖性神经元可塑性和脑白细胞征集). *J Neurosci* 22, 5865-5878。

47. Tuppo,E.E.和 Arias,H.R. (2005). The role of inflammation in Alzheimer's disease (炎症在阿耳茨海默病中的作用). *Int. J Biochem Cell Biol* 37, 289-305。

48. Yu, L.等(2006), Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1 (人间质细胞衍生因子 1 的新同工型的鉴定和表达)。

49. Zhu,Y., Yu,T., Zhang,X.C., Nagasawa,T., Wu,J.Y.和 Rao,Y. (2002). Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons(趋化因子 SDF-1 作为胚胎小脑神经元的脑膜引诱剂的作用). *Nat Neurosci* 5, 719-720。

50. Zou,Y.R., Kottmann,A.H., Kuroda,M., Taniuchi,I.和 Littman,D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development(趋化因子受体 CXCR4 在造血作用和小脑发育过程中的功能). *Nature* 393, 595-599。

51. Zujovic,V., Benavides,J., Vige,X., Carter,C.和 Taupin,V. (2000). Fractalkine modulates TNF-alpha secretion and neurotoxicity induced by

microglial activation (弗莱塔金能调节小胶质细胞激活诱导的 $\text{TNF}\alpha$ 分泌和神经毒性). *Glia* 29, 305-315。

序 列 表

<110> 应用研究系统 ARS 控股有限公司 N.V.
(Applied Research Systems ARS Holding N.V.)

<120> 用 SDF-1 治疗和/或预防神经疾病

<130> 1108 WO

<150> EP05110206.9

<151> 2005-10-31

<150> US 60/734,142

<151> 2005-11-07

<160> 18

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 68

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Lys
65

<210> 2

<211> 72

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Lys Arg Phe Lys Met
65 70

<210> 3
<211> 98
<212> PRT
<213> 人

<400> 3

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Lys Gly Arg Arg Glu Glu Lys Val Gly Lys Lys Glu Lys
65 70 75 80

Ile Gly Lys Lys Lys Arg Gln Lys Lys Arg Lys Ala Ala Gln Lys Arg
85 90 95

Lys Asn

<210> 4
<211> 68
<212> PRT
<213> 人

<400> 4

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Ala Ala Leu Ala Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Lys
65

<210> 5
<211> 21

<212> PRT
<213> 人

<400> 5

Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu
1 5 10 15

Cys Leu Ser Asp Gly
20

<210> 6
<211> 267
<212> DNA
<213> 人

<400> 6

atgaacgcc aagtcgtggt cgtgctggtc ctcgtgctga ccgcgtctg cctcagcgac 60
gggaagcccg tcagcctgag ctacagatgc ccatgccgat tcttcgaaag ccatgttgcc 120
agagccaacg tcaagcatct caaaattctc aacactccaa actgtgccct tcagattgta 180
gcccggctga agaacaacaa cagacaagtg tgcattgacc cgaagctaaa gtggattcag 240
gagtacctgg agaaagcttt aaacaag 267

<210> 7
<211> 69
<212> PRT
<213> 人

<400> 7

Met Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu
1 5 10 15

Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr
20 25 30

Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg
35 40 45

Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu
50 55 60

Lys Ala Leu Asn Lys
65

<210> 8
<211> 65
<212> PRT
<213> 人

<400> 8

Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala
1 5 10 15

Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala
20 25 30

Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile
35 40 45

Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn
50 55 60

Lys
65

<210> 9
<211> 66
<212> PRT
<213> 人

<400> 9

Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Val
1 5 10 15

Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys
20 25 30

Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys
35 40 45

Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu
50 55 60

Asn Lys
65

<210> 10
<211> 67
<212> PRT
<213> 人

<400> 10

Met Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His
1 5 10 15

Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn
20 25 30

Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val
35 40 45

Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala
50 55 60

Leu Asn Lys
65

<210> 11
<211> 69

<212> PRT
<213> 人

<400> 11

Met Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu
1 5 10 15

Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Ala Ala Leu Ala Ile Leu Asn Thr
20 25 30

Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg
35 40 45

Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu
50 55 60

Lys Ala Leu Asn Lys
65

<210> 12
<211> 68
<212> PRT
<213> 人

<400> 12

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Cys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Lys
65

<210> 13
<211> 300
<212> PRT
<213> 人

<400> 13

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Lys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
65 70 75 80

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
85 90 95

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
100 105 110

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
115 120 125

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
130 135 140

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
145 150 155 160

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
165 170 175

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
180 185 190

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
195 200 205

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
210 215 220

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
225 230 235 240

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
245 250 255

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
260 265 270

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
275 280 285

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290 295 300

<210> 14
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<400> 14

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Asn Leu Ile Ser Ala Ala Pro Ala Gly Lys Arg Val Ile
65 70 75 80

Ala Gly Ala Arg Ala Leu His Pro Ser Pro Pro Arg Ala Cys Pro Thr
85 90 95

Ala Arg Ala Leu Cys Glu Ile Arg Leu Trp Pro Pro Pro Glu Trp Ser
100 105 110

Trp Pro Ser Pro Gly Asp Val
115

<210> 15
<211> 69
<212> PRT
<213> 人

<400> 15

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Asn Cys
65

<210> 16
<211> 79
<212> PRT
<213> 人

<400> 16

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Lys Ile Trp Leu Tyr Gly Asn Ala Glu Thr Ser Arg
65 70 75

<210> 17
<211> 65
<212> PRT
<213> 人

<400> 17

Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Val
1 5 10 15

Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys
20 25 30

Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys
35 40 45

Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu
50 55 60

Asn
65

<210> 18
<211> 66
<212> PRT
<213> 人

<400> 18

Met Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His
1 5 10 15

Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn
20 25 30

Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val
35 40 45

Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala
50 55 60

Leu Asn
65

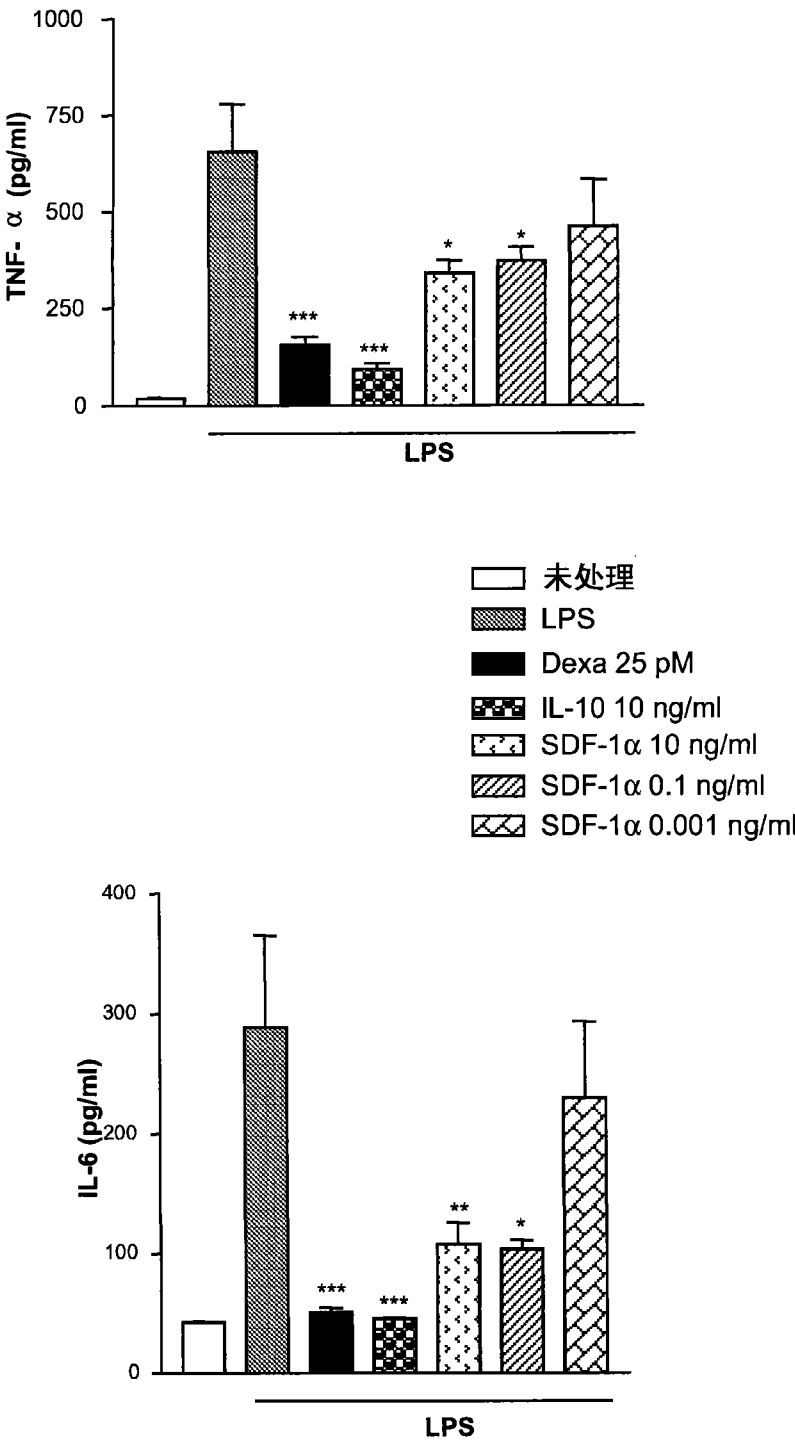


图 1A

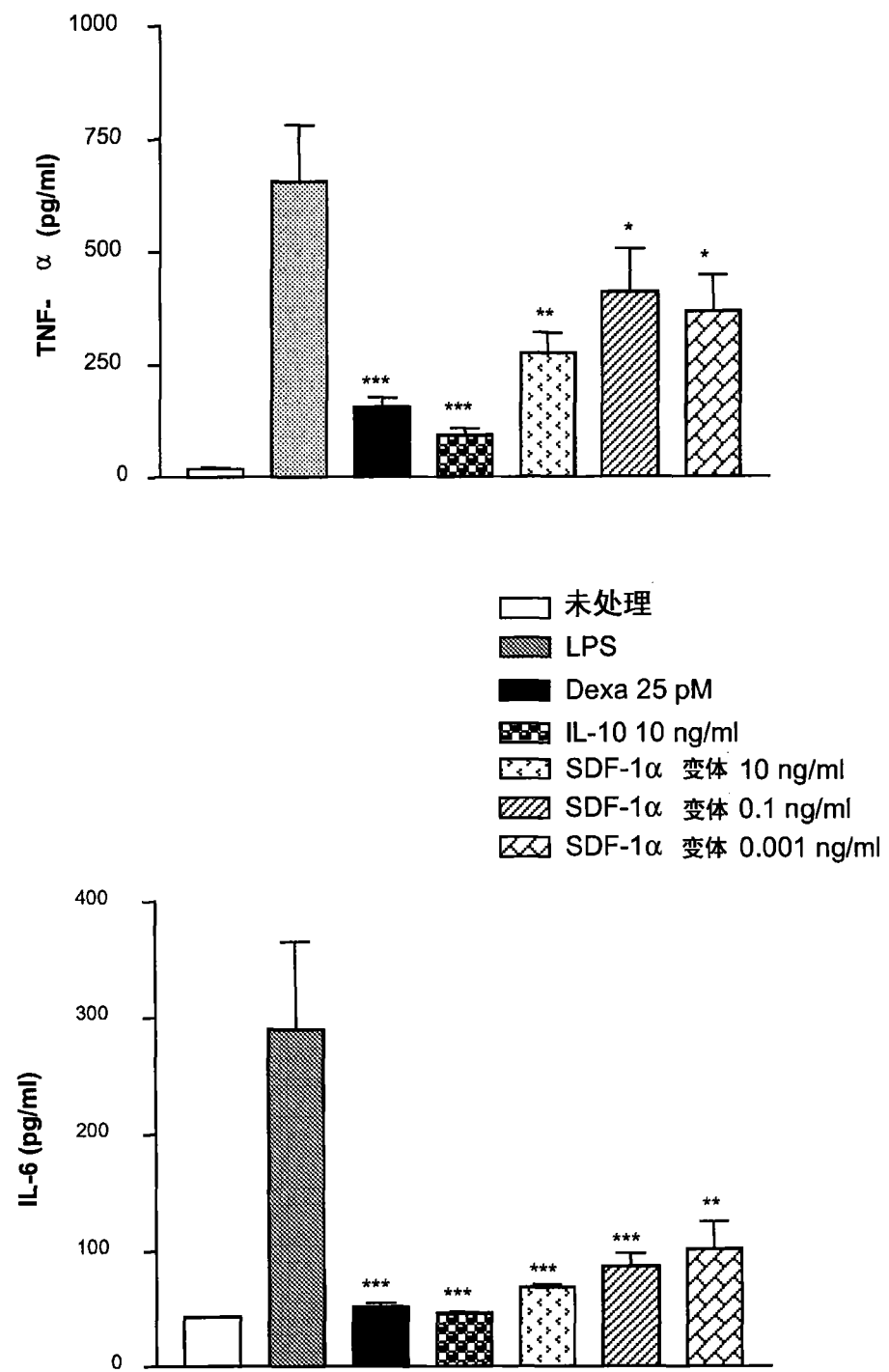


图 1B

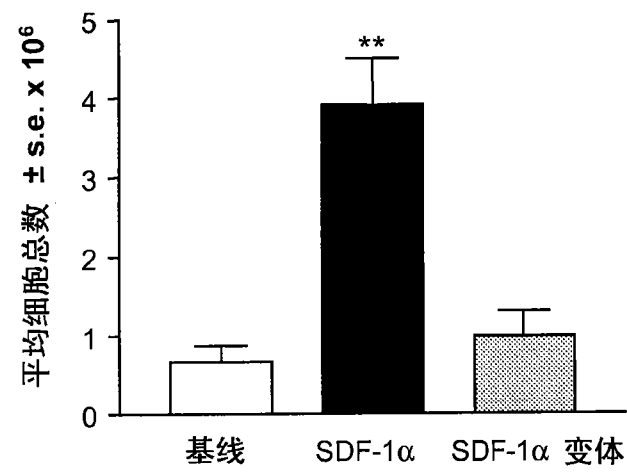


图 2

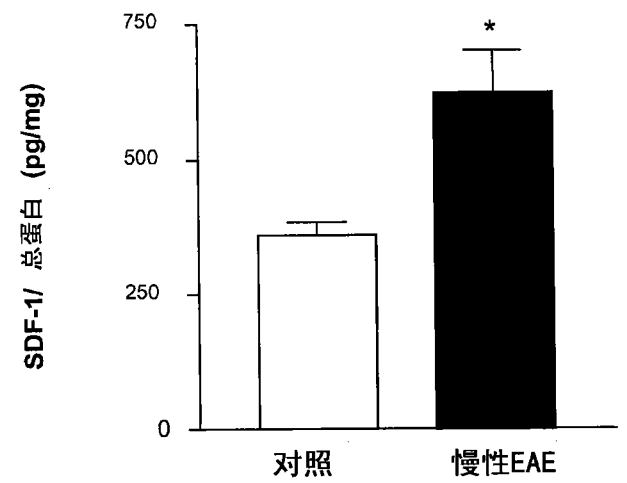
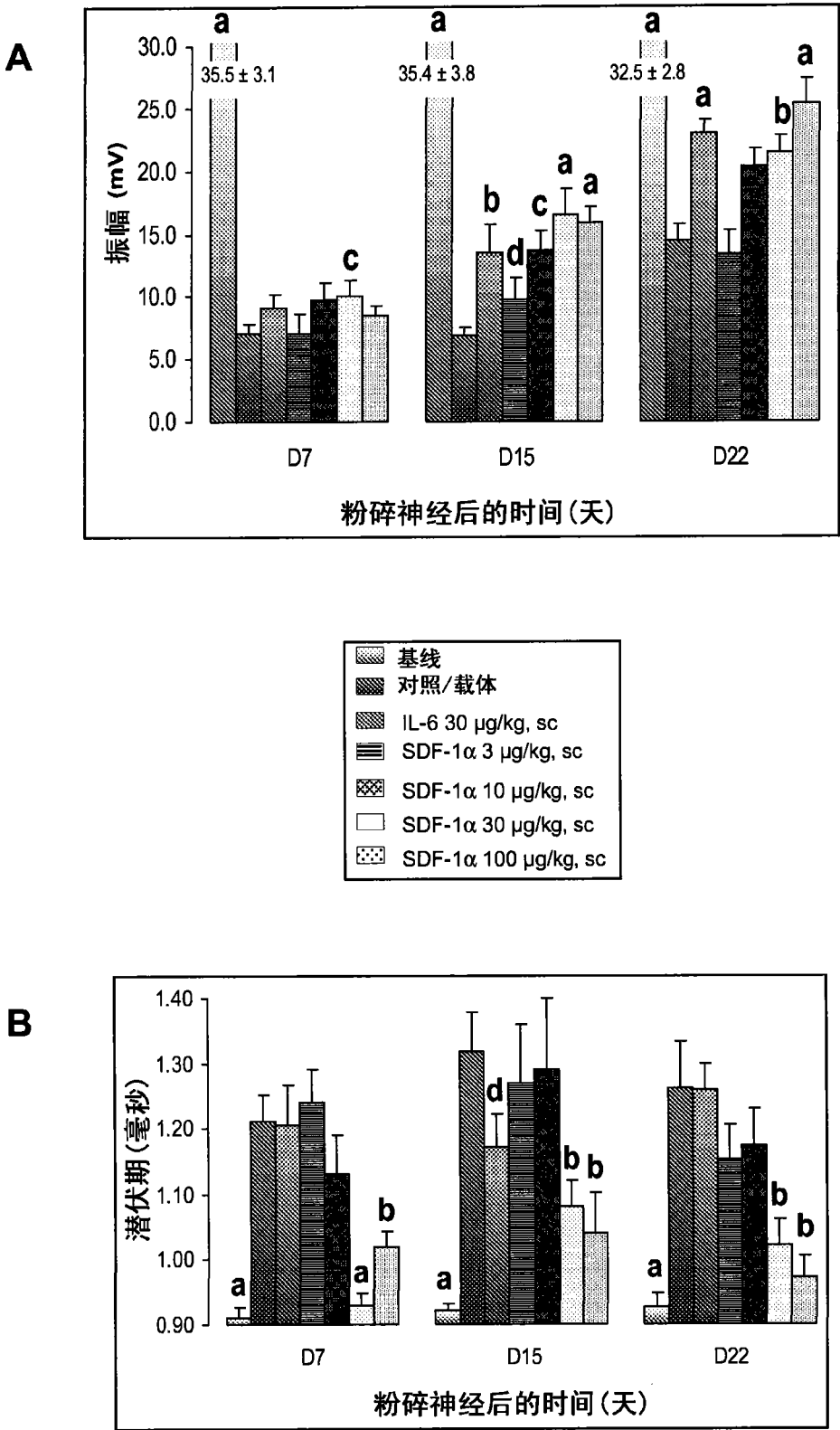
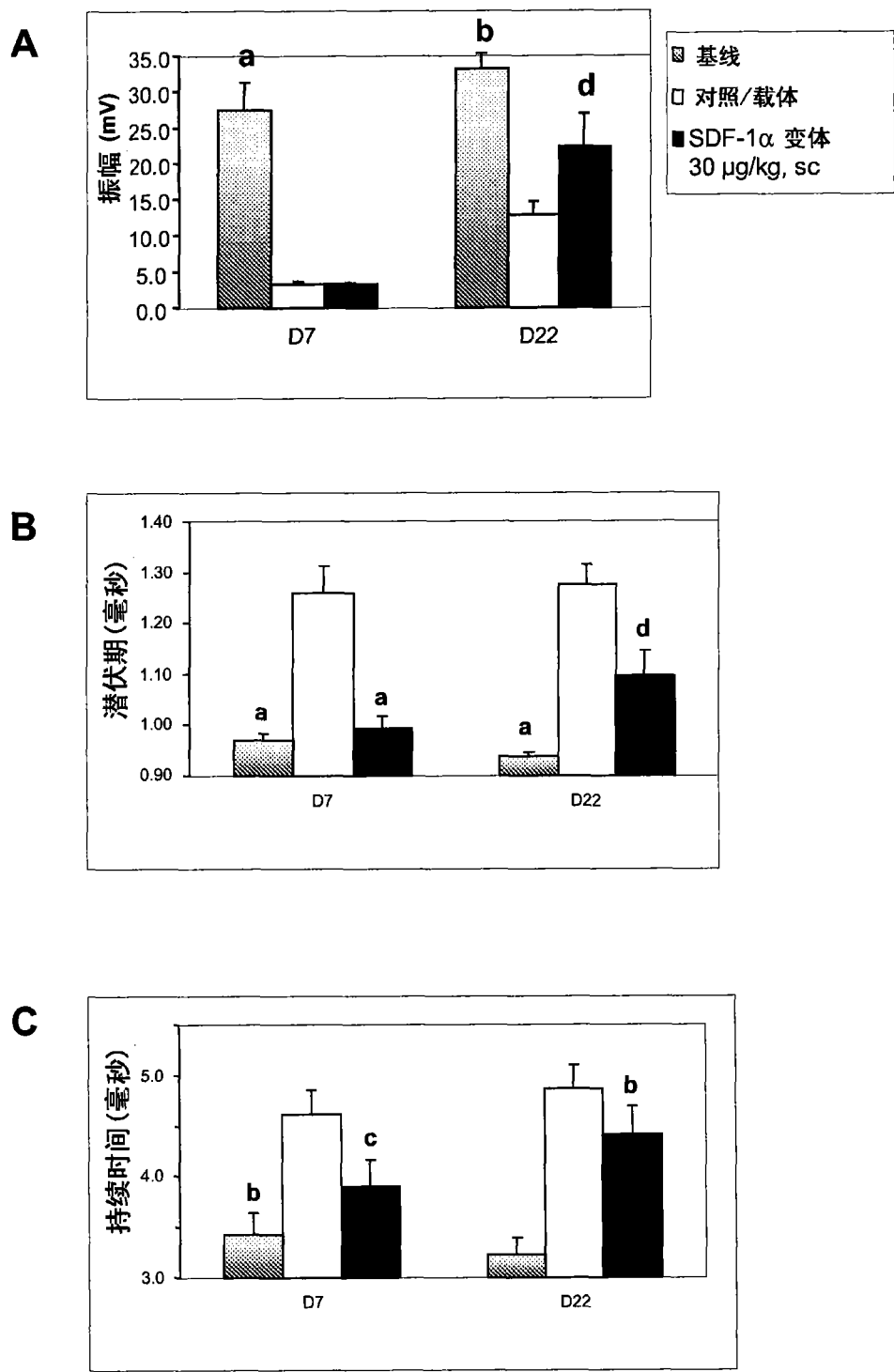


图 3





粉碎神经后的时间(天)

图 5

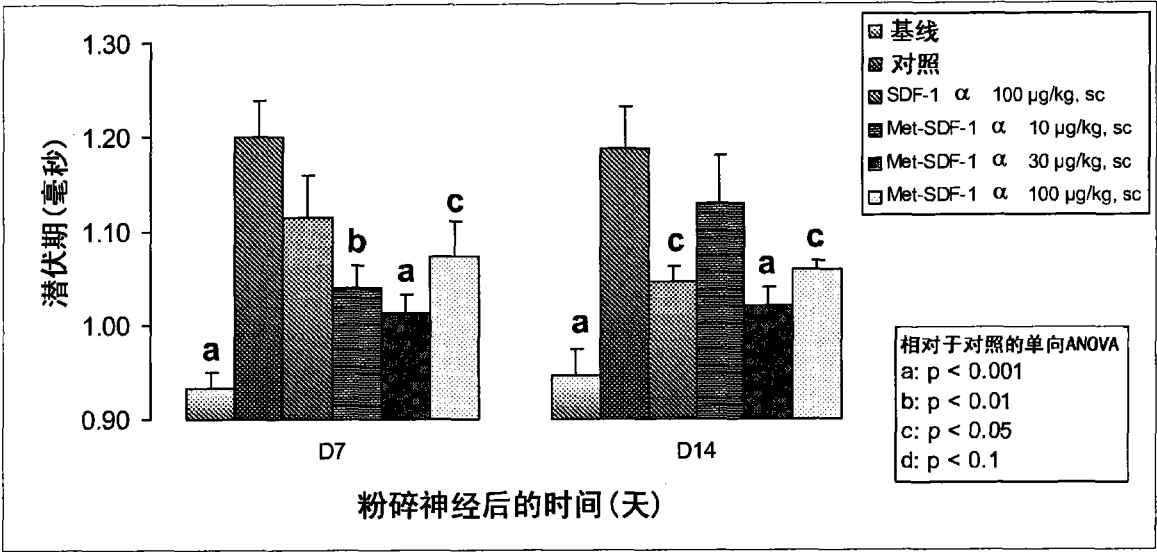
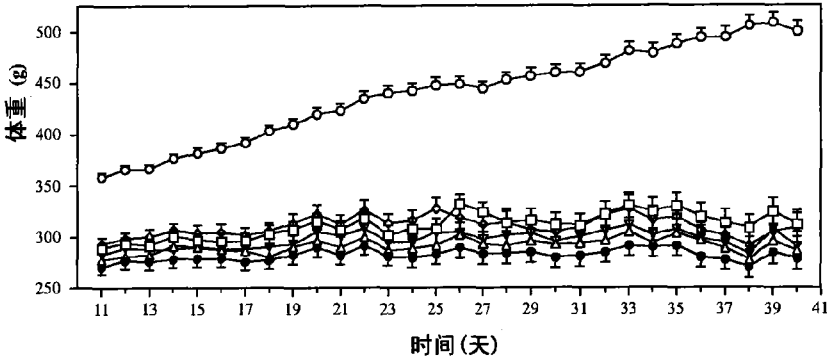


图 6

A. 体重

- 对照/载体
- STZ/载体
- STZ/AS900446 (10 μg/kg)
- △— STZ/AS900446 (30 μg/kg)
- ▽— STZ/AS900446 (100 μg/kg)
- ◇— STZ/IL-6 (10 μg/kg)

平均值 ± s.e.m



B. 高血糖

- 对照/载体
- STZ/载体
- ▨ STZ/AS900446 (10 μg/kg)
- ▤ STZ/AS900446 (30 μg/kg)
- ▥ STZ/AS900446 (100 μg/kg)
- ▩ STZ/IL-6 (10 μg/kg)

平均值 ± s.e.m

* p < 0.05 (对 STZ/载体)

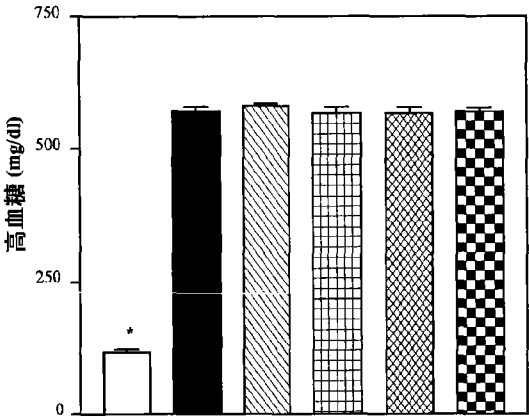
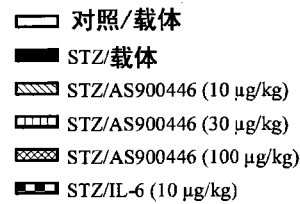
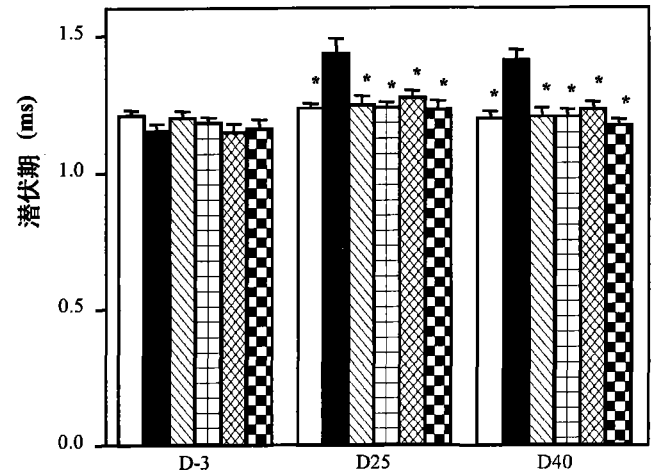


图 7

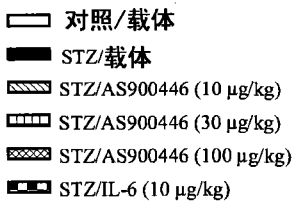
C. CMAP 潜伏期



平均值 ± s.e.m
* p < 0.05 (对 STZ/载体)



D. SNCV



平均值 ± s.e.m
* p < 0.05 (对 STZ/载体)

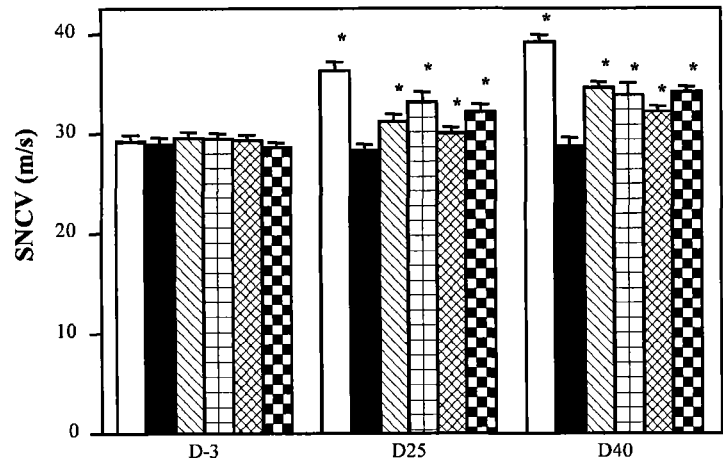
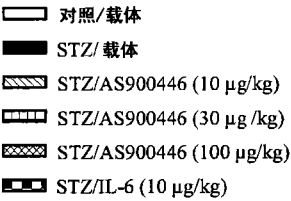
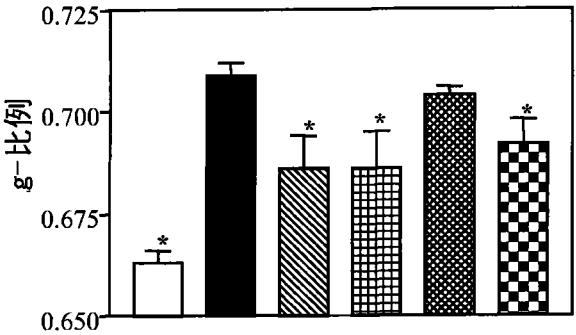


图 7续

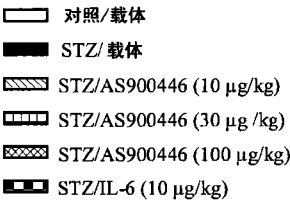
E. g-比例



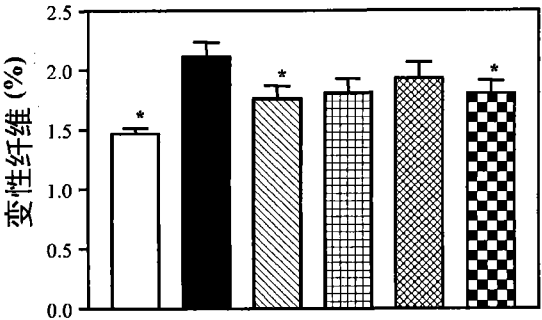
平均值 ± s.e.m
* p < 0.05 (对 STZ/载体)



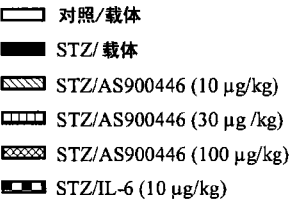
F. 变性纤维的比例



平均值 ± s.e.m
* p < 0.05 (对 STZ/载体)



G. 表皮内神经纤维的密度



平均值 ± s.e.m
* p < 0.05 (对 STZ/载体)

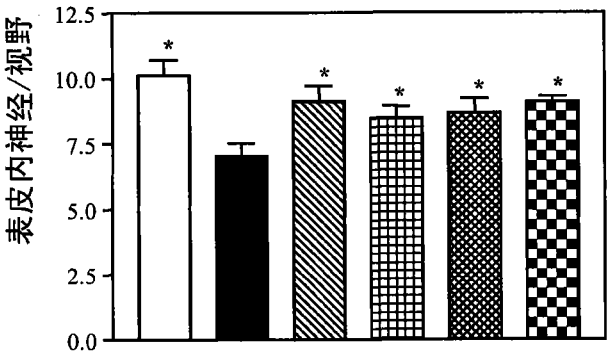
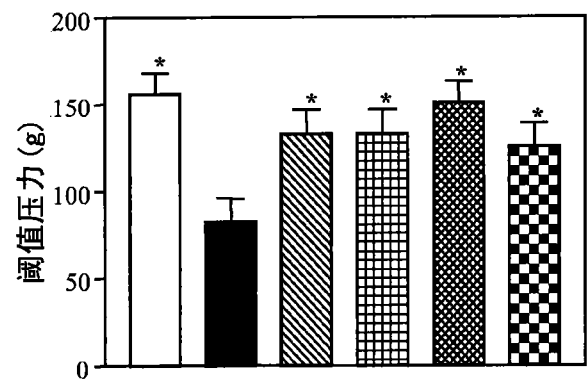


图 7续

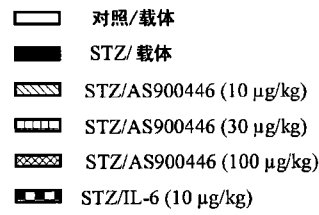
A. 凡-夫雷丝线试验



平均值 ± s.e.m
* p < 0.05 (对 STZ/载体)



B. 热板 52°C 试验



平均值 ± s.e.m
* p < 0.05 (对 STZ/载体)

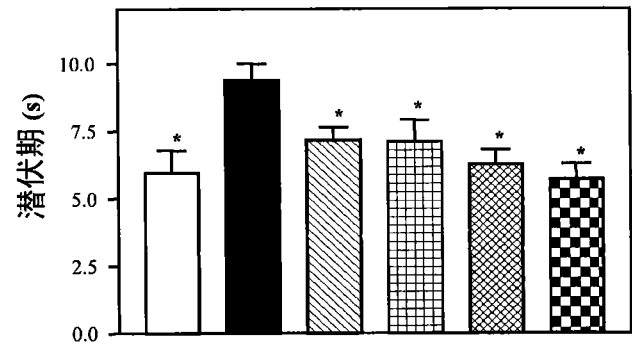


图 8

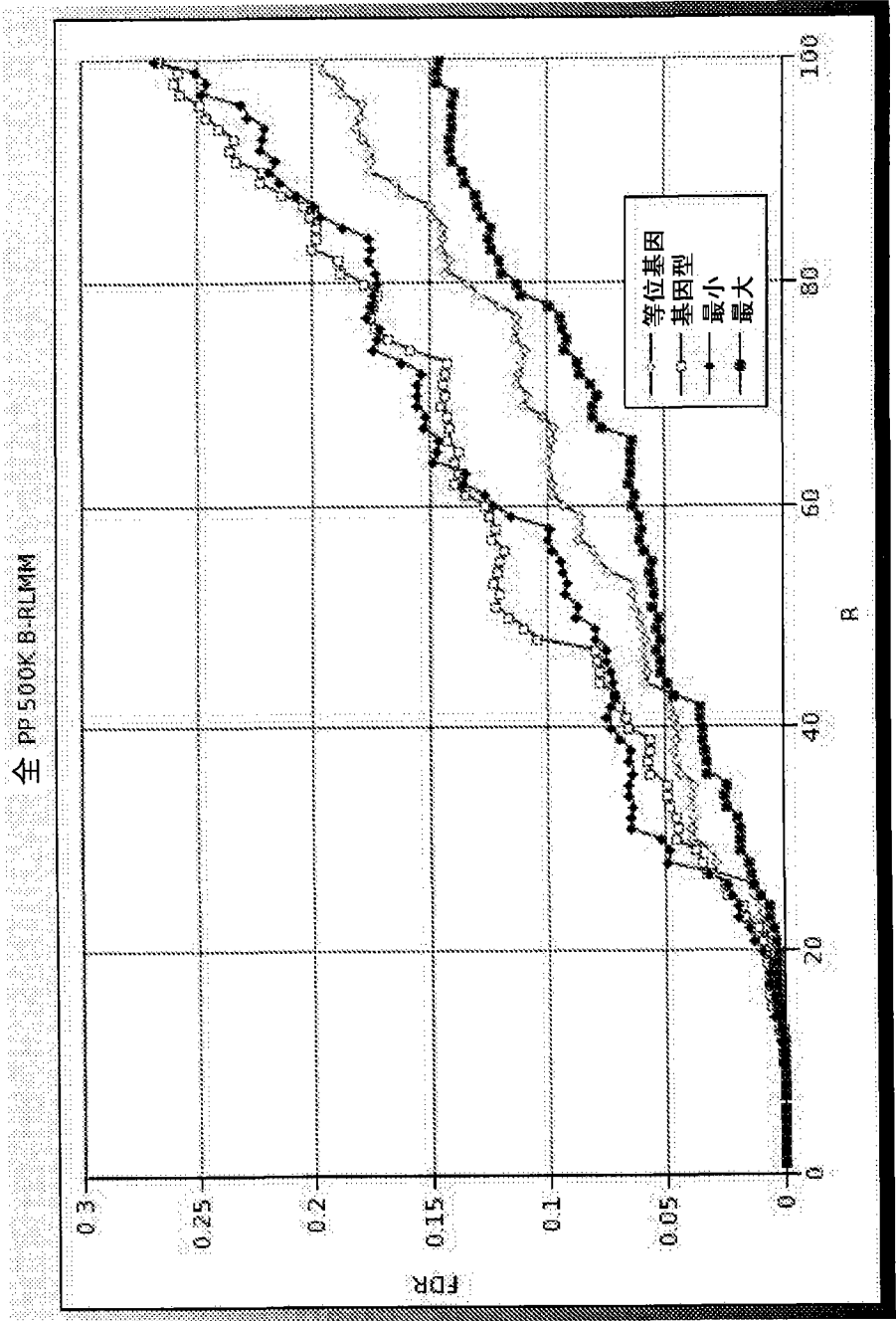


图 9

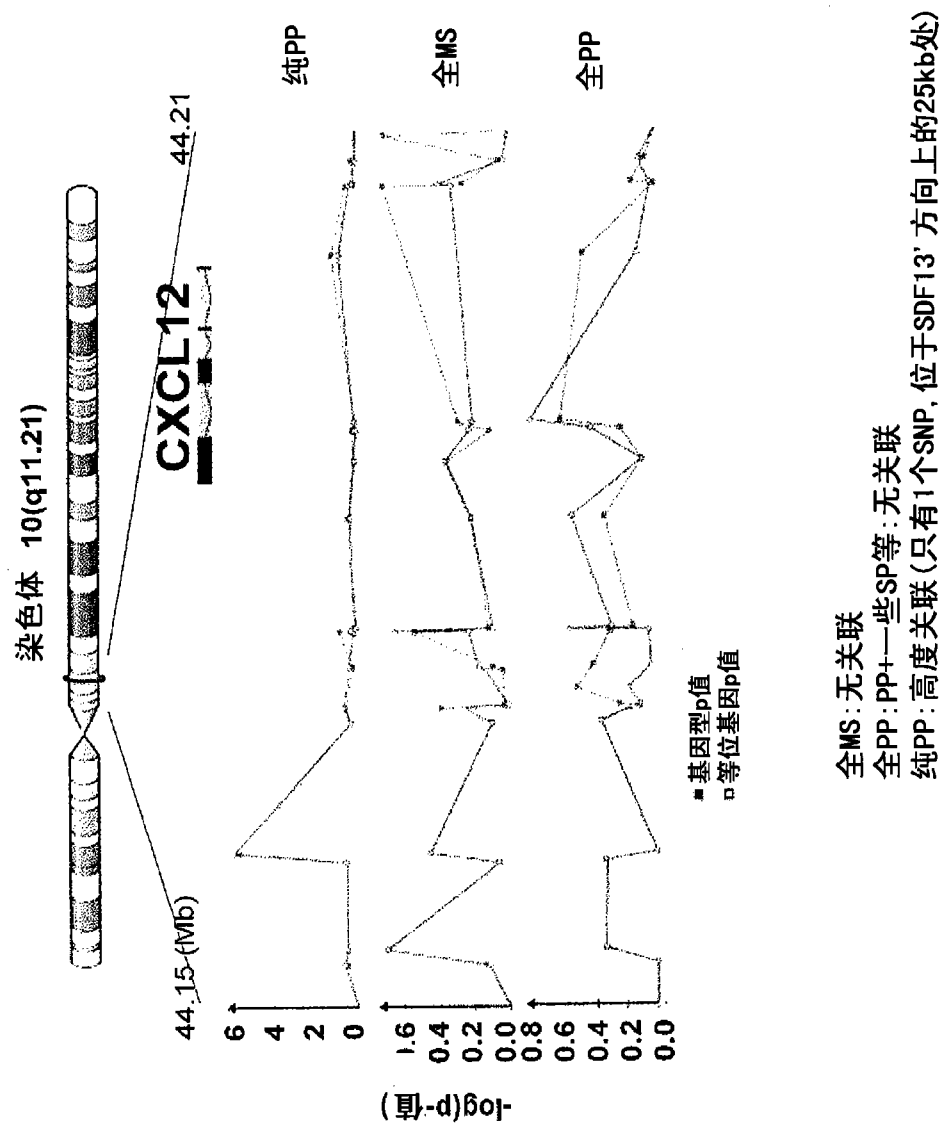


图 10

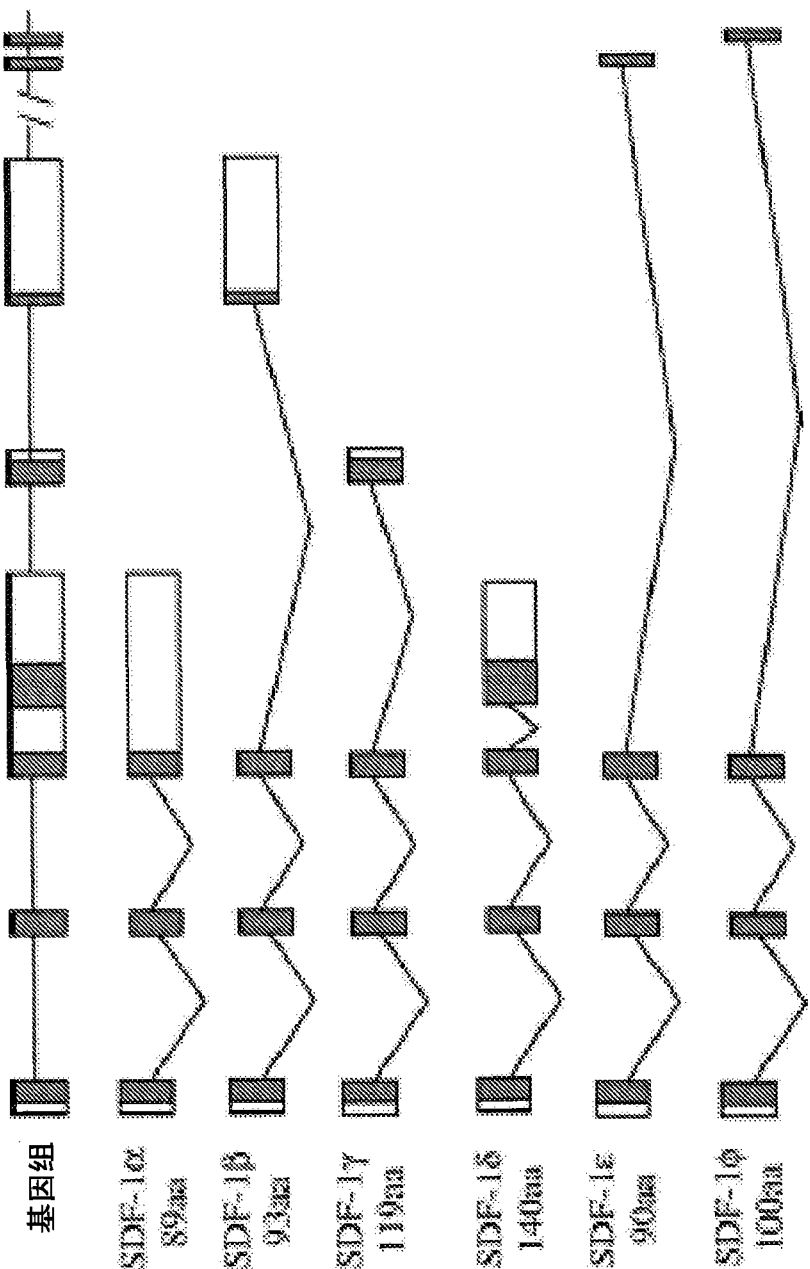


图 11

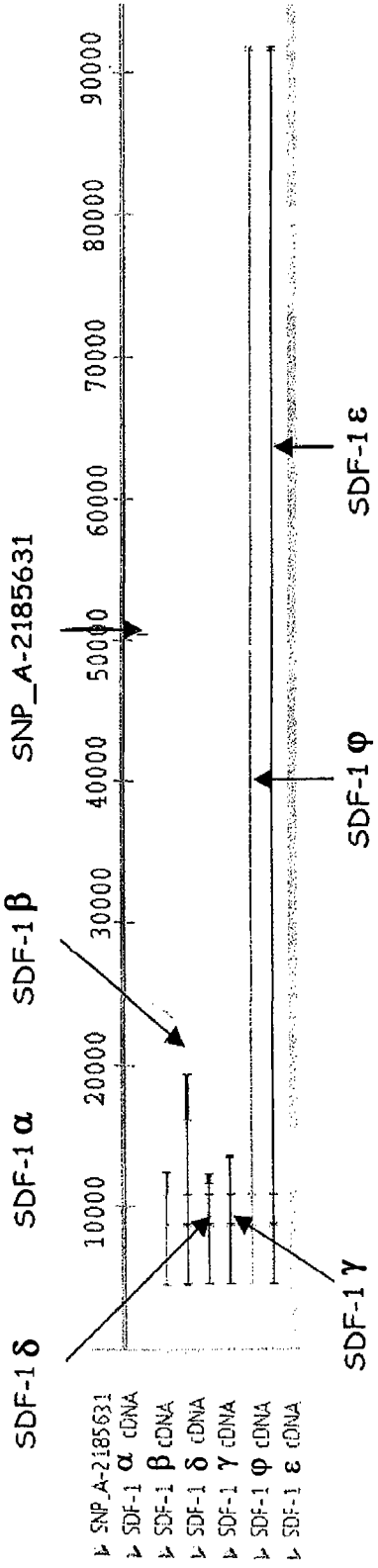


图 12